



Identification de catalyseurs à l'aide de criblages à haut débit basés sur des techniques immunoenzymatiques

Cristian-Paul Macovei

► To cite this version:

Cristian-Paul Macovei. Identification de catalyseurs à l'aide de criblages à haut débit basés sur des techniques immunoenzymatiques. Chimie. Université Paris Sud - Paris XI, 2008. Français. NNT : . tel-00447202

HAL Id: tel-00447202

<https://theses.hal.science/tel-00447202>

Submitted on 14 Jan 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ORSAY

N° D'ORDRE :

UNIVERSITE DE PARIS SUD

U.F.R. SCIENTIFIQUE D'ORSAY

THESE DE DOCTORAT

présentée par

Cristian-Paul Macovei

pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITE PARIS XI ORSAY

Spécialité Chimie Organique

**Identification de catalyseurs à l'aide de criblages à haut débit basés sur
des techniques immunoenzymatiques.**

Soutenance le 5 mai 2008 devant la commission d'examen composée de

MM.	Christophe Créminon	
	Marc Lemaire	Rapporteur
	Jean-Pierre Mahy	
	Frédéric Taran	Directeur de thèse
	Pierre-Yves Renard	Rapporteur
	Thomas R. Ward	Examineur

REMERCIEMENTS

Ce travail de recherche fait partie du projet IBAAC (*An Integrated Biomimetic Approach to Asymmetric Catalysis*) et a été financé par la Commission Européenne. Les activités se sont déroulées au Service de Chimie Bioorganique et de Marquage (SCBM) et au Service de Pharmacologie et d'Immunologie (SPI) du Commissariat à l'Energie Atomique à Saclay.

En premier lieu j'aimerais exprimer ma gratitude au Dr. Frédéric Taran, responsable du Laboratoire de marquage au carbone 14, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. Ses qualités scientifiques, son énergie, son enthousiasme ont apporté une contribution essentielle à ce travail, et, probablement, sans son apport, ce manuscrit aurait eu une valeur bien inférieure.

Je remercie également Sophie Dezard, coordonnateur du réseau européen de recherche IBAAC pour avoir fait que, tout au long de ce projet européen, tous les aspects administratifs soient gérés de la manière la plus professionnelle qui soit.

Pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance aux membres du jury : le Professeur Marc Lemaire de l'Université de Lyon, le Professeur Jean-Pierre Mahy de l'Université Paris XI, le Professeur Pierre-Yves Renard de l'Université de Rouen et le Professeur Thomas R. Ward de l'Université de Neuchâtel.

Ce travail a été possible aussi grâce au Dr. Christophe Créminon, chef du Service de Pharmacologie et d'Immunologie ainsi qu'à l'extraordinaire équipe du Laboratoire d'études et de recherches en immunoanalyse menée par le Dr. Hervé Volland. Une contribution très importante pour le développement du test immunologique à base d'anticorps polyclonaux est due à Marie-Claire Nevers.

Je tiens aussi à remercier vivement :

Le Professeur Pier Giorgio Cozzi de l'Université de Bologne, pour avoir mis à notre disposition une importante banque de ligands du cuivre sans laquelle le travail présent aurait été bien plus pauvre.

Une contribution importante à ce travail est due au Dr. Paola Vicennati qui a effectué un nombre important de synthèses et d'études immunologiques ainsi qu'à Sandra Gabillet qui a synthétisé certains produits décrits dans ce manuscrit.

L'ensemble du personnel des laboratoires de marquage au carbone 14, de marquage au tritium ainsi qu'au personnel du laboratoire de chimie bioorganique pour leur bonne humeur et pour les bons moments passés ensemble.

Un grand merci au Groupe d'analyse : David Buisson, Estelle Léonce, Elizabeth Zekri et Alain Valleix pour leur assistance et leur disponibilité.

Mais, avant tout, ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien constant de ma famille et surtout de ma chère épouse Oana. Et je vais finir à l'américaine : sachez que je vous aime tous !

Abréviations et symboles

Ac	acétyle
Acac	acétylacétonato
AcM	Anticorps monoclonal
ACN	acétonitrile
AcP	Anticorps polyclonal
AcOEt	acétate d'éthyle
aq	aqueux
Ar	aromatique
B	<i>Binding</i> – pourcentage de liaison en présence de compétiteur
B₀	<i>Binding₀</i> – pourcentage de liaison en absence de compétiteur
Bn	benzyle
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyle
Bipy	Bipyridine
BSA	Albumine bovine
<i>n</i>Bu	<i>n</i> -butyle
<i>t</i>Bu	<i>tert</i> -butyle
Bz	benzoyle
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CLHP	Chromatographie Liquide à Haute Performance
COD	1,5-Cyclooctadiène
Cp	Cyclopentadiényle
CPV	Chromatographie en phase vapeur
<i>p</i>-Cym	<i>para</i> -Cymène
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène
DCE	1,2-dichloroéthane
DCC	1,3-dicyclohexylcarbodiimide
DCM	Dichlorométhane
DMF	<i>N,N</i> -diméthylformamide
DMAP	4-(diméthylamino)pyridine
DMSO	diméthylsulfoxyde
DO	Densité Optique
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EtOH	éthanol
Et₂O	éther éthylique
Eq.	équivalent
<i>ee</i>	Excès énantiomérique
<i>ed</i>	Excès diastéréomérique
HBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraméthyluronium
	hexafluorophosphate
IR	infrarouge
MeOH	méthanol
MTBE	Méthyl <i>tert</i> -butyléther
<i>n</i>Pr	<i>n</i> -propyle
NHS	<i>N</i> -hydroxysuccinimide
ppm	Partie per million
Ph	phényle
<i>rd</i>	Rapport diastéréomérique
Rdt	rendement
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SATA	<i>N</i> -succinimidyl- <i>S</i> -acéthioacétate

SM	Spectrométrie de Masse
SMCC	succinimidyl-4-(<i>N</i> -maléimidométhyl)-cyclohexane-1-carboxylate
T.A.	température ambiante
TEA	triéthylamine
TFA	acide trifluoroacétique
THF	tétrahydrofurane
TMS	triméthylsilyl
TBDMS	<i>tert</i> -butyldiméthylsilyl
TRIS	tris(hydroxyméthyl)méthylamine
Ts	tosyle
UE	Unité enzymatique
UEI	Unité Ellman
UV	ultraviolet

Sommaire

Introduction générale	10
I. Principe des approches combinatoires pour la découverte de catalyseurs asymétriques	13
II. Tests de criblage rapides	16
II.1. Criblage de catalyseurs par des méthodes chromatographiques	18
II.2. Méthodes basées sur la spectroscopie UV-VIS et la fluorescence	22
II.3. Criblage de catalyseurs par thermographie infrarouge	26
II.4. Tests basés sur l'électrophorèse capillaire	27
II.5. Tests basés sur la spectrométrie de masse	29
II.6. Tests enzymatiques	30
III. Objectifs de la thèse	33
 Chapitre 1. Généralités sur les dosages immunologiques	34
I. Le système immunitaire et la structure des anticorps	34
I.1. Structure	34
I.2. Production des anticorps	35
I.2.1. Anticorps polyclonaux	35
I.2.2. Anticorps monoclonaux	37
II. Principaux types de dosage immunologique	38
II.1. Interaction anticorps-antigène	38
II.2. Méthodes par compétition	40
II.3. Méthodes type sandwich	43
 Chapitre 2. Criblage de réactions énantiosélectives à l'aide d'anticorps monoclonaux énantiospécifiques	46
I. Art antérieur et résultats du laboratoire	48
I.1. Rappel de la littérature sur les anticorps énantiospécifiques	48
I.2. Résultats du laboratoire	50
II. Optimisation de la technique de criblage	56
III. Synthèse d' α -hydroxy acides chiraux	62
III.1. Importance des hydroxy-acides	62
III.2. Voies d'accès aux structures de type α -hydroxyacide	63
III.3. Première réaction cible : la réaction d'insertion des espèces métal-carbénolide sur l'eau	65
III.3.1. Généralités sur les composés diazo et les carbenolides	65
III.3.2. Réactions d'insertion dans des liaisons O-H	69
III.3.3. Criblage de catalyseurs pour la réaction énantiosélective d'insertion d'espèces métal-carbénolide sur l'eau	76
a) Criblage des métaux de transition	76
b) Catalyse par le ruthénium	79
c) Catalyse par le rhodium	83
d) Catalyse par le cuivre, l'argent et l'or	86
III.3.4. Tentatives d'optimisation des meilleurs systèmes	94
III.3.5. Généralité du catalyseur	100
III.4. Deuxième réaction cible : réduction énantiosélective des céto-esters	101
III.4.1. Synthèse du substrat et de l'agent réducteur	103

III.4.2. Criblage de catalyseurs pour la réaction énantiosélective de réduction des cétoesters	104
IV. Conclusion	109
Chapitre 3. Criblage de réactions énantiosélectives à l'aide d'anticorps polyclonaux énantiosélectifs	112
I. Obtention et caractérisation des anticorps polyclonaux énantiosélectifs	114
I.1. Obtention d'anticorps polyclonaux anti N-benzoyl-lysine énantiosélectifs	115
I.1.1. Préparation des immunogènes et des traceurs enzymatiques	115
I.1.2. Suivi de la réponse immunitaire	117
I.2. Caractérisation des propriétés de liaison des anticorps polyclonaux anti N-benzoyl-lysine	121
I.2.1. Spécificité des anticorps polyclonaux autour de la chaîne latérale	122
I.2.2. Spécificité des anticorps polyclonaux pour le groupement N-benzoyle	124
II. Utilisation des anticorps polyclonaux énantiosélectifs	125
II.1. Réaction cible	125
II.2. Rappels bibliographiques	127
II.2.1. Ouverture des 5(4H)-oxazolones catalysée par des organocatalyseurs chiraux	127
II.2.2. Ouverture des 5(4H)-oxazolones catalysée par des complexes organométalliques chiraux	128
II.2.3. Ouverture des 5(4H)-oxazolones catalysée par les enzymes	129
II.3. Résultats	134
II.3.1. Synthèse d'une série de 5(4H)-oxazolones	134
II.3.2. Mise au point des conditions de catalyse	134
II.3.3. Criblage d'une série d'enzymes pour l'ouverture énantiosélective de 11 oxazolones	136
II.3.4. Application à la préparation d'acides aminés N-benzoylés marqués	139
Chapitre 4. Criblage de réactions de couplage par dosage sandwich	142
I. Art antérieur et résultats du laboratoire	142
I.1. Techniques de criblage de réactions de couplage décrites dans la littérature	142
I.2. Résultats du laboratoire	144
II. Objectifs. Nouvelle réaction cible	148
III. Résultats	152
III.1. Synthèse des substrats et du produit de couplage	152
III.2. Mise au point de la méthode de criblage	154
III.3. Synthèse d'une banque de ligands du cuivre (I)	154
III.4. Criblage à haut débit des catalyseurs	156
Conclusion générale	162
Partie expérimentale	166

Introduction générale

La *chiralité*¹ est une caractéristique de la nature qui joue un rôle très important dans les sciences et technologies actuelles. Cette propriété spatiale est déterminée par l'arrangement tridimensionnel des atomes d'une molécule. Dans la nature de nombreux composés présentent cette propriété, comme les acides aminés, les sucres et les acides nucléiques par exemple. Pour qu'une molécule puisse être chirale, il faut qu'un de ses atomes ne porte (par l'intermédiaire de liaisons covalentes) que des substituants différents. Les composés possédant un centre chiral se présentent sous forme de deux constituants distincts, non superposables et étant l'un l'image de l'autre dans un miroir. Ces deux constituants portent le nom d'*énantiomères*².

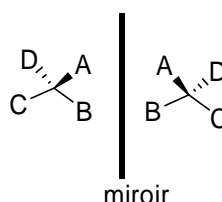


Figure 1. Les deux énantiomères d'une même molécule

Ils ont les mêmes propriétés chimiques et physiques et ne peuvent être différenciés que dans un environnement chiral ou par la façon dont ils provoquent la rotation de la lumière polarisée.

Les molécules chirales représentent des composés d'une importance cruciale pour les industries pharmaceutiques, agricoles et chimiques d'aujourd'hui. Dans de très nombreux cas il est important pour ces industries de ne synthétiser qu'un seul énantiomère d'une molécule cible, l'énantiomère actif (aussi appelé *eutomère*) pour des raisons d'économie mais aussi parce que l'énantiomère non souhaité (*distomère*) peut présenter des effets indésirables. Parmi les molécules d'intérêt industriel dont les deux énantiomères présentent des activités différentes on peut citer les cas de l'*albuterol*³ (l'énantiomère *S* a un effet broncho-dilatateur et anti-asthmatique tandis que le *R* augmente l'hypersensibilité du trait respiratoire) et la *ketamine*⁴ (*S*

¹ Chiral, chiralité provient du grec *cheir* qui signifie main

² Enantiomère provient du grec *enantios* (opposé)

³ H.S. Nelson, G. Bensch, W.W. Pleskow, R. DiSantostefano, S. DeGraw, D.S. Reasner, T.E. Rollins, P.D. Rubin, *J. Allergy. Clin. Immun.* **1998**, 102, 943.

⁴ P.F. White, J. Ham, W.L. Way, A.J. Trevor, *Anesthesiology* **1980**, 52, 231.

est un anesthésique et un analgésique tandis que le *R* produit des hallucinations et agitation), sans oublier la *thalidomide*⁵ (l'eutomère a des propriétés hypnotiques et sédatives mais le distomère est un puissant tératogène).

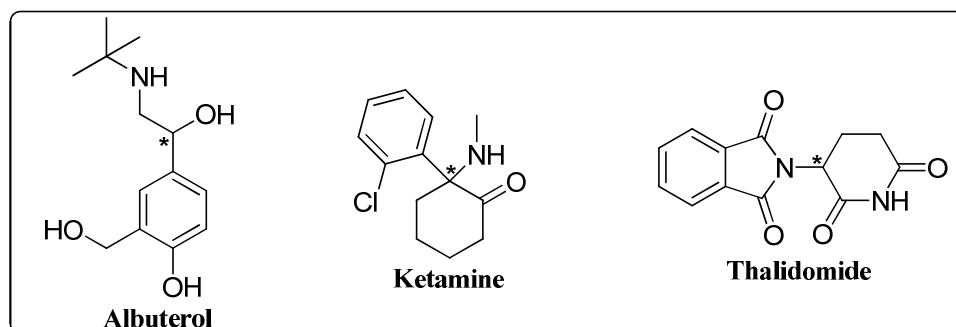


Schéma 1. Quelques exemples de composés dont les énantiomères possèdent des activités biologiques différentes.

Il existe plusieurs stratégies pour accéder aux composés énantiomériquement purs. La première consiste à partir d'une molécule faisant partie du « *pool chiral* » et de la transformer par les méthodes classiques de la chimie organique en un nouveau produit optiquement pur. Une autre méthode utilise des composés racémiques, qui, par résolution, peuvent conduire à des produits énantiopurs. Cette méthode reste d'un grand intérêt pour l'industrie car elle permet l'obtention de quantités importantes de produit optiquement pur⁶. Par contre l'inconvénient de cette approche est que le rendement théorique pour un énantiomère est de 50%, sauf dans le cas où l'énantiomère non souhaité peut être recyclé. Dans les processus de résolution cinétique des mélanges racémiques, un énantiomère réagit beaucoup plus vite que l'autre pour fournir le produit énantiomériquement enrichi et, dans les meilleurs des cas, ce second énantiomère ne réagit pas. Une version efficace de la résolution cinétique est la résolution cinétique dynamique qui permet la conversion totale d'un mélange racémique en un produit optiquement pur. Finalement la dernière méthode, et probablement la plus efficace, pour accéder à des produits chiraux, reste la *synthèse asymétrique*⁷, et, surtout la *catalyse asymétrique*⁸.

⁵ a) W.G. McBride, *Lancet* **1961**, 2, 1358, b) W. Lenz, *Deutsche Medizinische Wochenschrift* **1961**, 86, 2555, c) M. Rouhi, *Chem. Eng. News* **2005**, 83,3.

⁶ A.N. Collins, G.N. Sheldrake, J. Crosby Eds. *Chirality in Industry II*, Wiley, Chichester, **1997**.

⁷ a) H.B. Kagan, J.C. Fiaud, *Top. Stereochem.* **1978**, 10, 175; b) J.D. Morrison, *Asymmetric Synthesis*, vol. 1-3,5, Academic, New York, **1983-1985**, c) J.A. Gladysz, J. Michl, *Chem. Rev.* **1992**, 92, 739.

⁸ E.N. Jacobsen, A. Pfaltz, H. Yamamoto Eds., *Comprehensive Asymmetric Catalysis*, Springer, Berlin, **1999**.

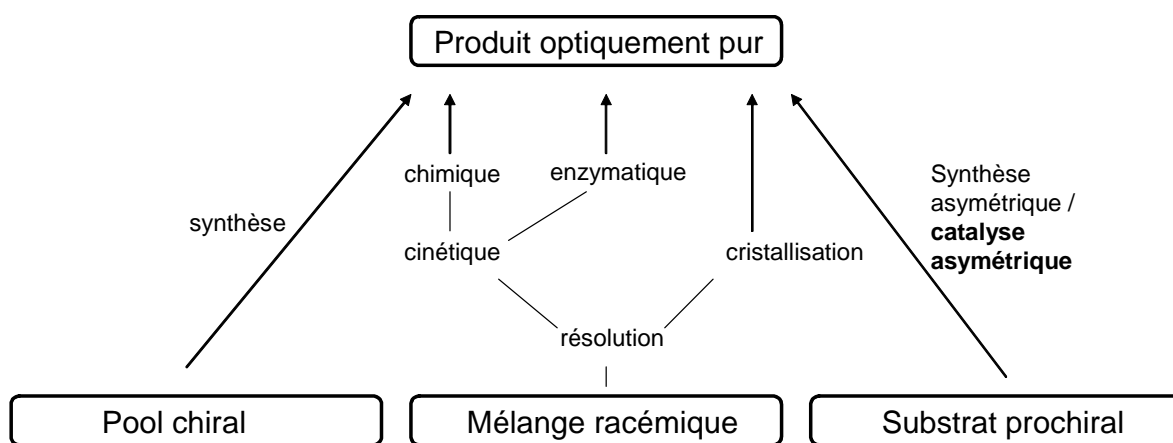


Figure 2. Trois principales voies d'accès aux produits optiquement purs.⁹

La synthèse asymétrique présente l'avantage que le produit de départ est achiral et que, par l'utilisation de réactifs chiraux celui-ci va conduire à un produit comportant des centres stéréogènes par un processus appelé d'énantiosélection. Probablement l'aspect le plus important est que ce type de processus peut être rendu *catalytique*.

Un catalyseur est une entité capable d'accélérer une réaction chimique sans changer la thermodynamique de ce processus et sans être consommé durant cette réaction¹⁰. Sans l'emploi d'un catalyseur, un processus chimique peut être soit trop onéreux soit tout simplement impossible. Ces entités chimiques jouent un rôle important dans tous les types de processus chimiques que ce soit au niveau de la recherche et développement ou de la production proprement dite. La catalyse asymétrique est probablement le procédé de choix en raison de son efficacité en terme d'*économie d'atomes* et surtout, d'*économie de chiralité*. Dans la plupart des cas la catalyse asymétrique permet l'élaboration de procédés respectueux de l'environnement, pouvant réaliser une multiplication/amplification importante de la chiralité à partir de très peu de matériel optiquement pur et, par conséquent, produisant peu de déchets à la fin de la réaction.

Comme R. Noyori l'a énoncé en 1994, la catalyse asymétrique est une « chimie à quatre dimensions ». Ainsi, l'efficacité d'une réaction chimique peut être obtenue par la combinaison entre une structure tridimensionnelle (x, y, z) et une cinétique correspondante (t)¹¹. Par conséquent, la conception d'un catalyseur asymétrique ayant une activité prévisible est une tâche extrêmement compliquée voire impossible. Les catalyseurs organométalliques, obtenus par complexation d'un métal par un ligand ou des ligands chiraux, sont les catalyseurs asymétriques

⁹ R.A. Sheldon, *Chirotechnology*, Marcel Dekker, New York, **1993**.

¹⁰ M. Mavrikakis, *Nature Mater.* **2006**, 5, 847.

¹¹ R. Noyori, *Asymmetric Catalysis in Organic Synthesis*, Wiley-Interscience, New York, **1994**.

les plus décrits dans la littérature. De même, le perfectionnement du catalyseur pour obtenir la combinaison idéale entre le métal, le ligand et le substrat représente aussi une étape importante dans le développement du procédé afin d'obtenir une multiplication de la chiralité maximale.

Il est évident que le cahier des charges présenté est extrêmement complexe et la conception d'un catalyseur efficace pour une transformation donnée représente une tâche très difficile.

Inspiré des approches utilisées par l'industrie pharmaceutique pour la découverte accélérée de molécules biologiquement actives, des stratégies basées sur l'utilisation de techniques alliant chimie combinatoire et criblage à haut débit ont commencé à être suivies dans les années 1990 pour la découverte de catalyseurs.

Sans se vouloir exhaustifs, les paragraphes suivants résument les travaux et les avancées majeures réalisées dans ce domaine durant les 10 dernières années.

I. Principe des approches combinatoires pour la découverte de catalyseurs asymétriques

La découverte de nouveaux matériaux fonctionnels, comme les catalyseurs chimiques, est dominée par les découvertes fortuites¹². Traditionnellement les catalyseurs étaient découverts par des méthodes du type « par tâtonnement » (*trial and error*). Dans les deux dernières décennies les méthodes de la chimie combinatoire et du criblage à haut débit ont été développées ce qui a permis une accélération significative du processus de découverte de catalyseurs efficaces.

Un catalyseur efficace repose sur une combinaison réussie de plusieurs facteurs comme une bonne conception rationnelle, intuition, persistance et, bien sûr, une dose non négligeable de chance. Ces paramètres ne sont pas actuellement totalement maîtrisables ce qui rend l'approche traditionnelle de recherche de catalyseurs chimiques très empirique¹³. Pour soutenir ce point de vue, que l'aspect empirique du processus est au moins aussi important que la compréhension mécanistique du phénomène, on peut citer un exemple relativement récent¹⁴, illustré dans le schéma 2.

¹² G. Kirsten, W.F. Maier, *Appl. Surf. Sci.* **2004**, 223, 87.

¹³ K. Ding, H. Du, Y. Yuan, J. Long, *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 2872.

¹⁴ C. M. Killian, D.J. Tempel, L.K. Johnson, M. Brookhart, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 11664.

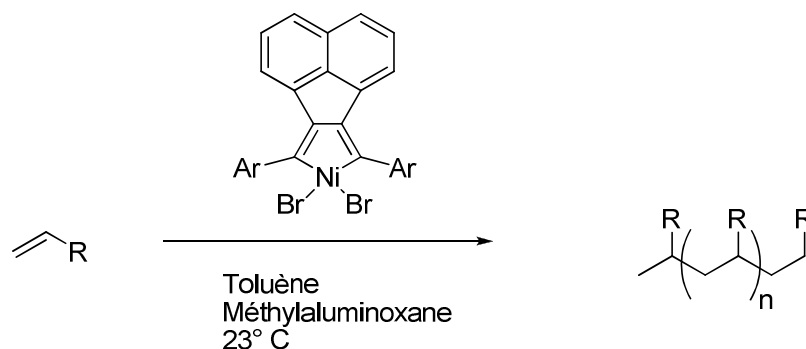


Schéma 2. Polymérisation des alcènes par des complexes de nickel.

Dans ce cas, une classe importante de catalyseurs pour la polymérisation des alcènes a été découverte par des moyens classiques après être longtemps resté inconnue malgré l'activité très intense dans le domaine. La raison pour laquelle cette découverte a été tardive repose sur le fait que, conformément aux arguments mécanistiques de l'époque, les métaux de transition de la partie droite du tableau périodique ne permettaient pas de catalyser ce type de réaction¹⁵.

De nombreux autres exemples pris dans la littérature auraient pu illustrer le fait que pléthore de catalyseurs soit le fruit de découvertes fortuites ou de combinaisons improbables.

On peut considérer que la recherche de nouveaux systèmes catalytiques dépend donc à la fois de l'originalité de leur conception et du nombre d'expériences menées en un temps donné. Si le premier de ces facteurs dépend de l'état des connaissances et de l'intuition du chercheur, le second est avant tout un problème d'ordre technique et peut être résolu au moins en partie par les technologies développées en chimie combinatoire et criblage à haut débit¹³.

Les méthodes de la chimie combinatoire appliquées à la recherche de catalyseurs impliquent trois étapes: la préparation rapide et parallèle d'une banque de catalyseurs souvent obtenus par combinaison de ligands avec divers métaux, l'usage de ces systèmes organométalliques pour une ou plusieurs réactions cibles en utilisant un test ou une méthode adaptée et, finalement, l'identification de la ou des combinaisons présentant les meilleures performances pour les propriétés recherchées¹⁶(figure 3).

¹⁵ M.A. Giardello, M.S. Eisen, C.L. Stern, T.J. Marks, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12114.

¹⁶ R. H. Crabtree, *Chem. Comm.* **1999**, 1611.

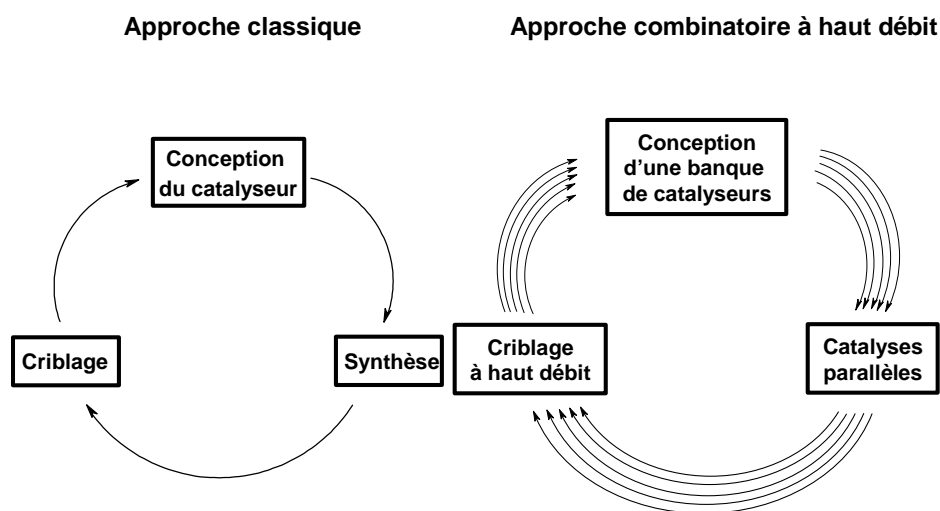


Figure 3. Comparaison entre l'approche « classique » et l'approche « combinatoire à haut débit » pour la découverte des catalyseurs efficaces

Ainsi, l'approche combinatoire permet en un cycle d'expérience d'obtenir un ensemble conséquent d'informations susceptibles d'être utilisées pour un nouveau cycle et ceci jusqu'à obtention du catalyseur recherché. Cette approche est donc en théorie bien plus performante que l'approche dite « classique » qui ne génère qu'un nombre d'informations bien plus limité par cycle d'expérience.

Cependant, deux points critiques sont à souligner dans l'approche combinatoire :

- il est nécessaire de mettre au point une préparation rapide des divers systèmes catalytiques, ceci peut être délicat notamment dans le cas de synthèse de ligands chiraux et
- il est indispensable de disposer d'une méthode de criblage rapide et fiable permettant de mettre en lumière les meilleurs catalyseurs.

La préparation de la banque de catalyseurs organométalliques fait souvent appel à la synthèse en mode parallèle de ligands selon des stratégies classiquement suivies pour l'élaboration de molécules biologiquement actives. Ainsi ces synthèses utilisent fréquemment la chimie sur support solide, ou des séquences courtes de synthèse sont réalisées en mode homogène. Ce type de stratégie a été appliqué pour la première fois en 1995 quand J.A. Ellman a synthétisé en parallèle une petite banque de ligands chiraux de dix membres de type pyrrolidinéméthanol, ligands utilisés ensuite pour la réaction d'addition énantiosélective du diéthyl zinc sur les aldéhydes¹⁷. La synthèse parallèle des ligands se fait sur support solide par réaction du *N*-[(éthoxy)carbonyl]-4-hydroxyprolinéméthylester avec un grand excès de réactif

¹⁷ G.C. Liu, J.A. Ellman, *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 7712.

de Grignard (R_1MgX) et transformation de l'azote protégé par réduction en groupement méthyle ou hydrolyse et alkylation réductrice, comme décrit dans le schéma 3.

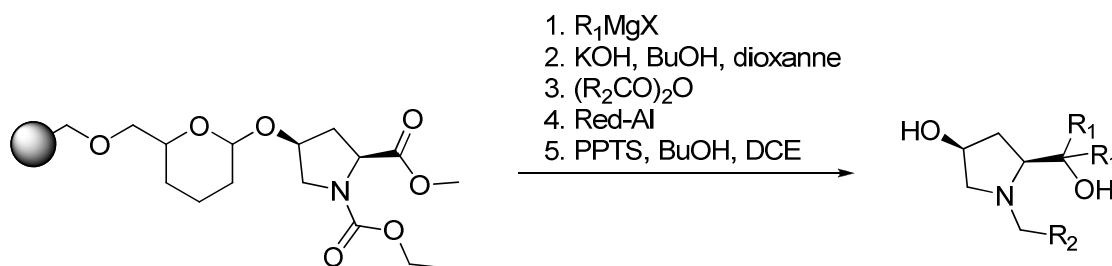


Schéma 3. Stratégie de synthèse d'une librairie de ligands chiraux type pyrrolidineméthanol

De nombreux autres exemples de synthèse parallèle existent, la grande majorité étant décrite dans l'excellente revue de C. Gennari et U. Piarulli¹⁸.

En revanche, la mise au point de tests de criblage spécifiques demande fréquemment des efforts particuliers et fait souvent appel à l'ingéniosité des chercheurs impliqués dans ce domaine. Ainsi, un grand nombre de techniques originales dédiées au criblage spécifique de banques de catalyseur a été décrit dans la littérature durant les 10 dernières années. Il existe à l'heure actuelle un certain nombre d'articles disponibles dans la littérature qui font l'état de l'art en ce qui concerne les techniques de criblage à haut débit¹⁹.

Le paragraphe suivant tente de résumer les avancées majeures dans ce domaine en se limitant toutefois aux projets reliés à la catalyse asymétrique.

II. Tests de criblage rapides

Pour une réaction catalytique donnée de transformation d'un composé **A** en un composé d'intérêt **B** il faut, dans un premier temps disposer d'un test de criblage capable de détecter spécifiquement le produit de la réaction **B** dans le mélange souvent complexe résultant de la réaction. Ceci est un aspect important car souvent les réactions chimiques catalytiques non optimisées produisent des mélanges de produits, et, pour quantifier le bon produit, il faut envisager, la plupart du temps, une étape de purification. Une fois le test mis au point la première

¹⁸ C. Gennari, U. Piarulli, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 3071.

¹⁹ a) M.G. Finn, *Chirality* **2002**, *14*, 534; b) M.T. Reetz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1335; c) J.F. Traverse, M.L. Snapper, *Drug Discov. Today* **2002**, *7*, 1002; d) M.T. Reetz, *Comb. Chem. & HTS* **2006**, *9*, 295.

étape du criblage est représentée par l'essai, pour un métal donné **M**, d'une série de ligands, ici **L₁ – L₈** (cf. figure 4). Le ligand le plus actif/sélectif est ensuite sélectionné (ici **L₃**) et sa structure est variée afin d'obtenir une famille de ligands ayant des structures proches (**L_{3a} – L_{3n}**). Parmi ces ligands, les meilleurs systèmes (ex. **L_{3e}, L_{3m}**) sont ensuite utilisés pour prouver la généralité du catalyseur : des composés de la même famille que le produit de départ **A** sont utilisés (**A₁ – A₇**) et parmi ceux-ci les meilleurs sont sélectionnés (**A₅** pour **L_{3e}** et **A₂, A₄ et A₆** pour **L_{3m}**). A ce point, le processus de découverte/optimisation de catalyseur est terminé et les meilleurs résultats représentent des systèmes ternaires du type **M/L_x/A_y**.

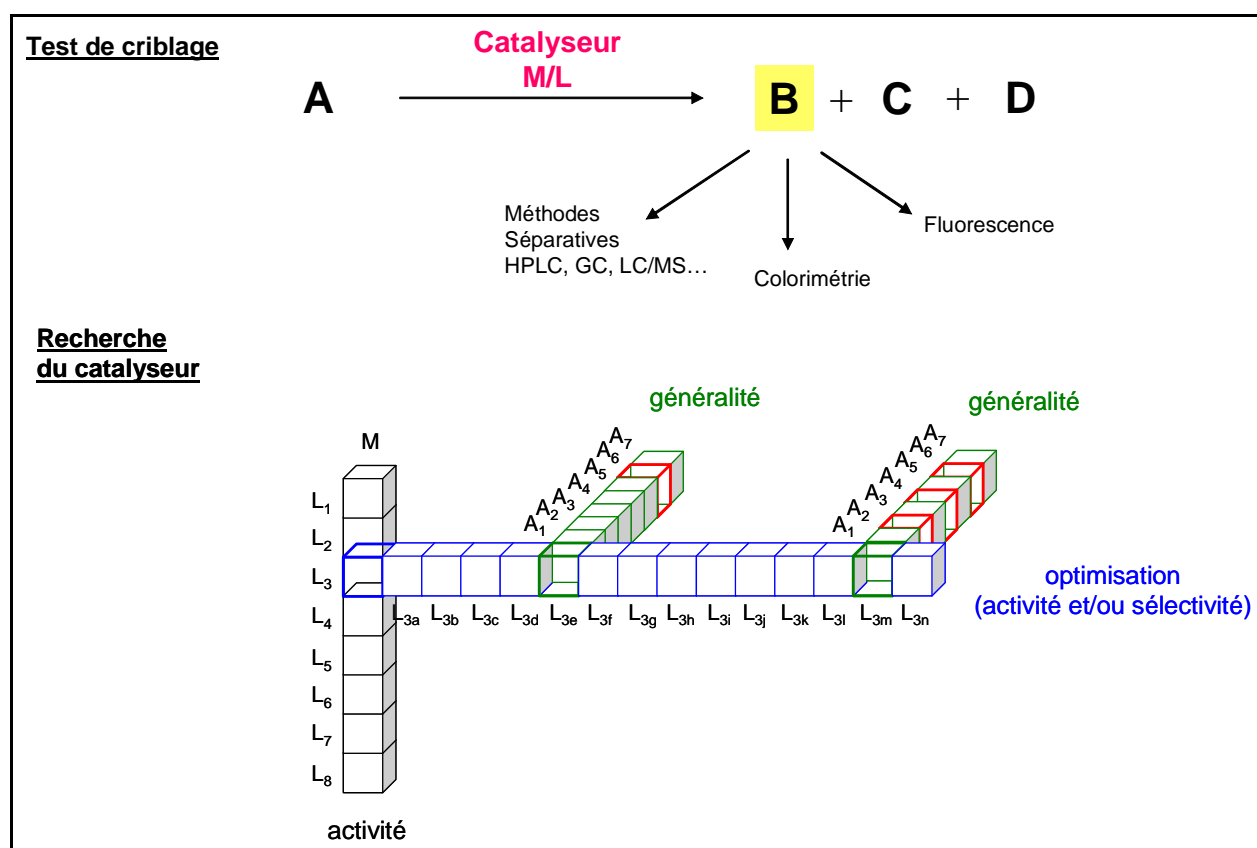


Figure 4. Présentation schématique de la stratégie appliquée à la découverte de catalyseurs

Un test de criblage doit donc dans l'absolu permettre de cribler l'ensemble des expériences représentées dans la figure 4 de manière à identifier la ou les meilleures combinaisons.

Plusieurs critères permettant d'évaluer un test de criblage doivent être soulignés :

- fiabilité (pas de faux positifs et des faux négatifs)
- reproductibilité et robustesse (simplicité des procédures)

- rapidité (grande capacité de criblage, automatisation, standardisation – ex. plaque 96 puits)
- généralité (capacité de s'appliquer à plusieurs substrats ou réactions)

Rares sont les tests de criblage disponibles actuellement qui possèdent l'ensemble de ces qualités.

Le criblage à haut débit (*high throughput screening*) dans l'industrie pharmaceutique est devenu si efficace dans les années 1990 que, depuis, c'est la synthèse des candidats ayant une structure « *drug like* » qui est devenue l'étape limitante dans le processus de découverte de nouveaux médicaments²⁰. Dans le domaine de la découverte de catalyseurs les méthodes de criblage à haut débit et de synthèse combinatoire sont apparues récemment, et ont été développées ensemble.

Dans ce document nous allons présenter une sélection des méthodes qui nous ont paru remarquables dans le domaine.

Au sein de ce chapitre nous allons nous limiter aux méthodes susceptibles de s'appliquer à la découverte de catalyseurs pour les réactions énantiosélectives.

II.1. Criblage de catalyseurs par des méthodes chromatographiques

Les techniques chromatographiques « classiques », en phase vapeur ou en phase liquide, utilisant des phases stationnaires chirales, ont été les premières méthodes de criblage de catalyseurs asymétriques ayant été utilisées. Ce type de méthode, connue et utilisée depuis longtemps par les chimistes, n'est pas vraiment une méthode de criblage à haut débit. En effet, même une fois optimisées, les conditions de la CLHP ou CPV nécessitent un temps minimum d'analyse d'échantillons (typiquement ~30 minutes/échantillon) portant le nombre d'analyse par jour à seulement quelques dizaines. Ceci représente l'inconvénient majeur de la technique chromatographique, elle reste une méthode « en série » ne pouvant pas attendre le rendement d'une méthode « en parallèle ». Ce propos doit toutefois être relativisé par les récents progrès techniques qui permettent de faciliter l'utilisation de cette technique (passeur automatique d'échantillons) mais aussi d'augmenter les cadences en diminuant le temps d'analyses. Ainsi de nouveaux appareils, toujours plus performants, ont vu le jour depuis les travaux décrits dans ce paragraphe, ces matériels ont bien évidemment un coût proportionnel à leur efficacité.

²⁰ J.K. Borckhardt, *Today's Chemist at Work* **1998**, 7, 35.

En ce qui concerne le criblage à l'aide de la CPV chirale, dans un travail publié en 2001, M.T. Reetz présente le criblage à haut débit de la résolution cinétique du *rac*-2-phényl-1-propanol catalysée par des lipases mutantes²¹.

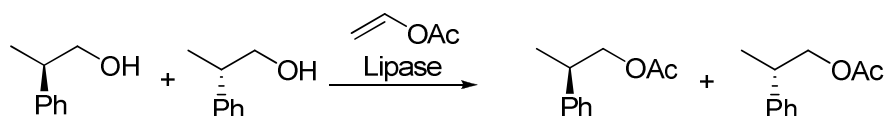


Schéma 4. Réaction modèle pour le criblage à haut débit utilisant la CPV chirale

Dans cette étude, par l'utilisation de deux chromatographes en phase vapeur et en injectant les différents échantillons à un certain intervalle de temps, les auteurs réussissent à obtenir un système capable de réaliser la mesure de l'excès énantiomérique de plus de 700 échantillons par jour, en tenant compte du fait que la durée d'une analyse est inférieure à 3,7 minutes. Il est à remarquer que le système d'injection est complètement automatisé et le traitement des données se fait à l'aide d'un ordinateur. Pour accélérer l'analyse, un échantillon est injecté avant que l'analyse de l'échantillon précédent soit terminée, ce qui conduit à l'obtention des chromatogrammes superposés. Une fois la méthode mise au point celle-ci permet d'obtenir des pics exploitables, sans superposition, et par conséquent de pouvoir accéder à la valeur de l'*ee*.

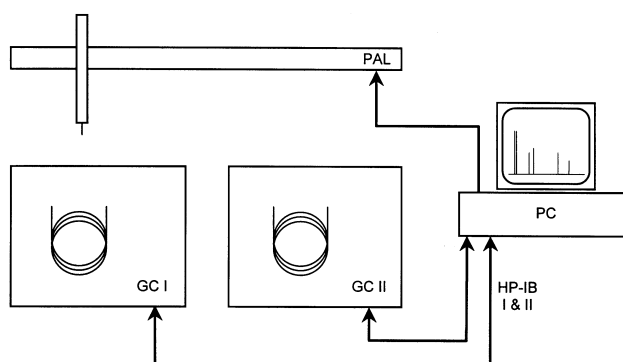


Figure 5. Schéma du double chromatographe en phase vapeur utilisé par M.T. Reetz

²¹ M.T. Reetz, K.M. Kühling, S. Wilensek, H. Husmann, U.W. Häusig, M. Hermes, *Catal. Today* **2001**, 67, 389.

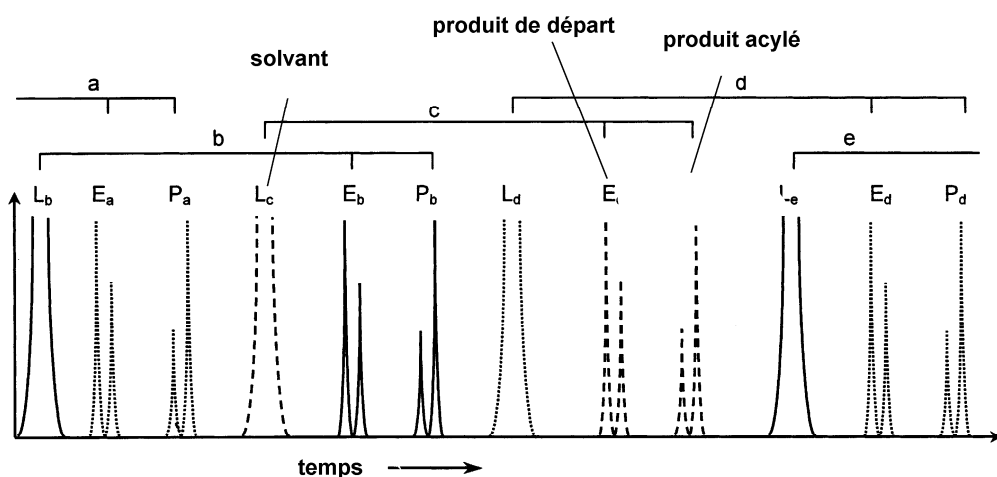


Figure 6. L'injection décalée des échantillons conduit à des chromatogrammes « superposés ».

Dans la figure 6 est présenté un chromatogramme obtenu en injectant des échantillons en mode continu. On observe qu'en choisissant soigneusement les conditions de séparation on peut obtenir des signaux exploitables (**L** représente le solvant, **E** le produit de départ et **P** le produit acylé).

Dans une autre étude²², parue en 2002, le criblage à haut débit utilisant la CPV chirale est employé pour réaliser des mesures d'excès énantiomérique dans un milieu multi-composant. Ainsi, pour l'addition énantiosélective du diéthyl zinc sur un aldéhyde, deux catalyseurs sont évalués sur trois aldéhydes différents.

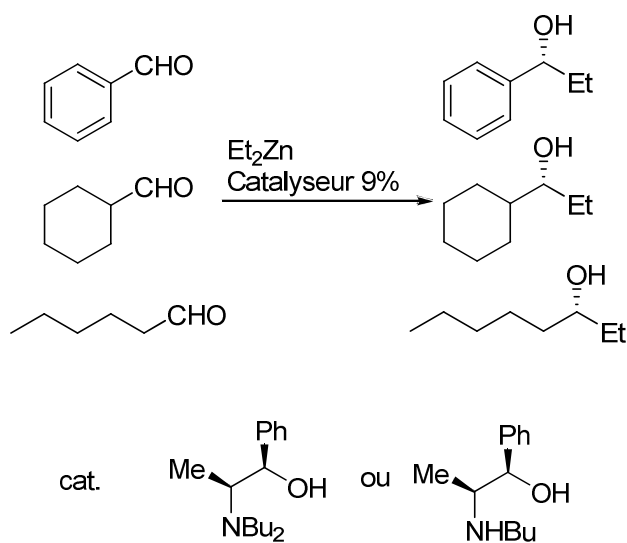


Schéma 5. Exemple de catalyse asymétrique multi-substrat

²² C. Wolf, P.A. Hawes, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 2727.

La simple injection du milieu réactionnel permet d'accéder rapidement à la valeur de l'induction asymétrique, à l'énantiosélectivité, au rendement chimique, à l'activité du catalyseur et à la spécificité du substrat pour le catalyseur chiral. La figure suivante présente le chromatogramme typique obtenu pour ce genre d'expérience. Ceci a permis aux auteurs d'identifier le système binaire catalyseur / substrat (1*R*,2*S*)-*N,N'*-dibutylnorephedrine / cyclohexanecarboxaldéhyde comme étant le plus performant parmi les systèmes testés, avec un rendement de 96% et un excès énantiomérique de 97% (*R*).

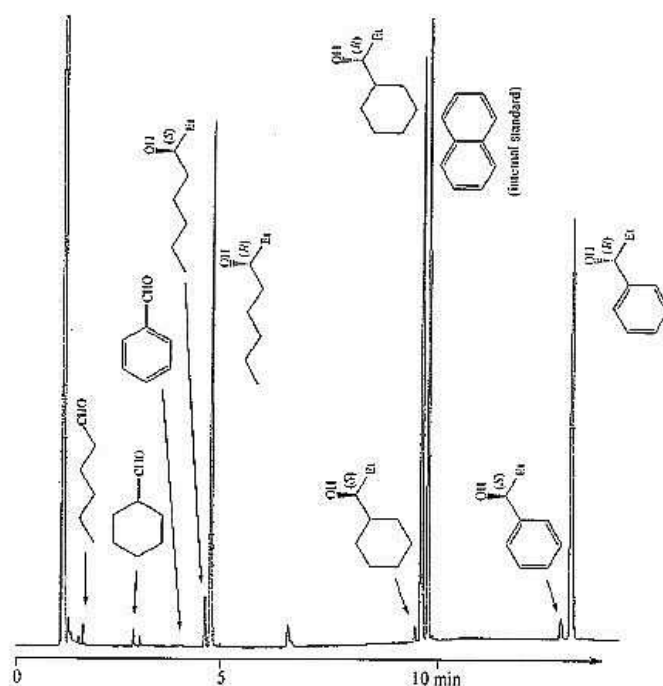


Figure 7. Chromatogramme chirale de l'expérience multi-substrat

Un autre exemple très intéressant de criblage multi-substrat a été publié par H.B. Kagan²³, appliqué à la réaction de réduction énantiosélective des cétones par le borane en présence d'organocatalyseurs borés chiraux.

²³ a) X. Gao, H.B. Kagan, *Chirality* **1998**, 10, 120; b) T. Satyanarayana, H.B. Kagan, *Adv. Synth. Catal.* **2005**, 347, 737 (review).

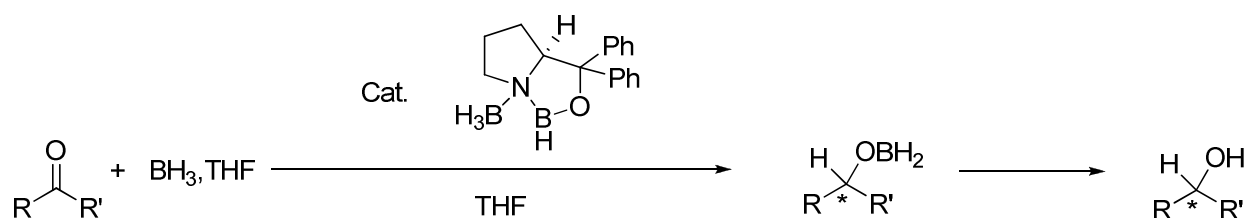


Schéma 6. Réduction énantiosélective des cétones par le borane chiral en présence d'un organocatalyseur chiral

Les substrats sont organisés en groupes pour ne pas générer de superpositions de pics lors des séparations en CLHP.

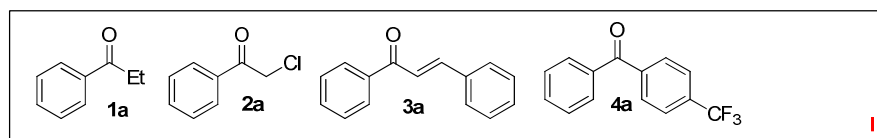


Schéma 7. Groupe de cétones capables de fournir une séparation correcte en CLHP chirale

A la fin de la catalyse une simple injection en CLHP chirale permet de séparer les 12 composants du mélange (4 cétones et 8 énantiomères des alcools).

Cette méthode est intéressante car elle permet en une seule analyse d'obtenir plusieurs mesures de *ee*. Par contre, l'inconvénient de ce procédé est représenté par le fait que le criblage peut se faire seulement dans le cas d'un groupe de substrats fournissant une séparation exploitable en CLHP entre les différents composants du brut réactionnel.

II.2. Méthodes basées sur la spectroscopie UV-VIS et la fluorescence

Un type de test énantiosélectif basé sur la fluorescence a été développé par J.-L. Reymond et nous allons présenter ici son application pour la réaction d'hydrolyse asymétrique d'acétates chiraux²⁴.

²⁴ G. Klein, J.-L. Reymond, *Helv. Chim. Acta* **1999**, 82, 400.

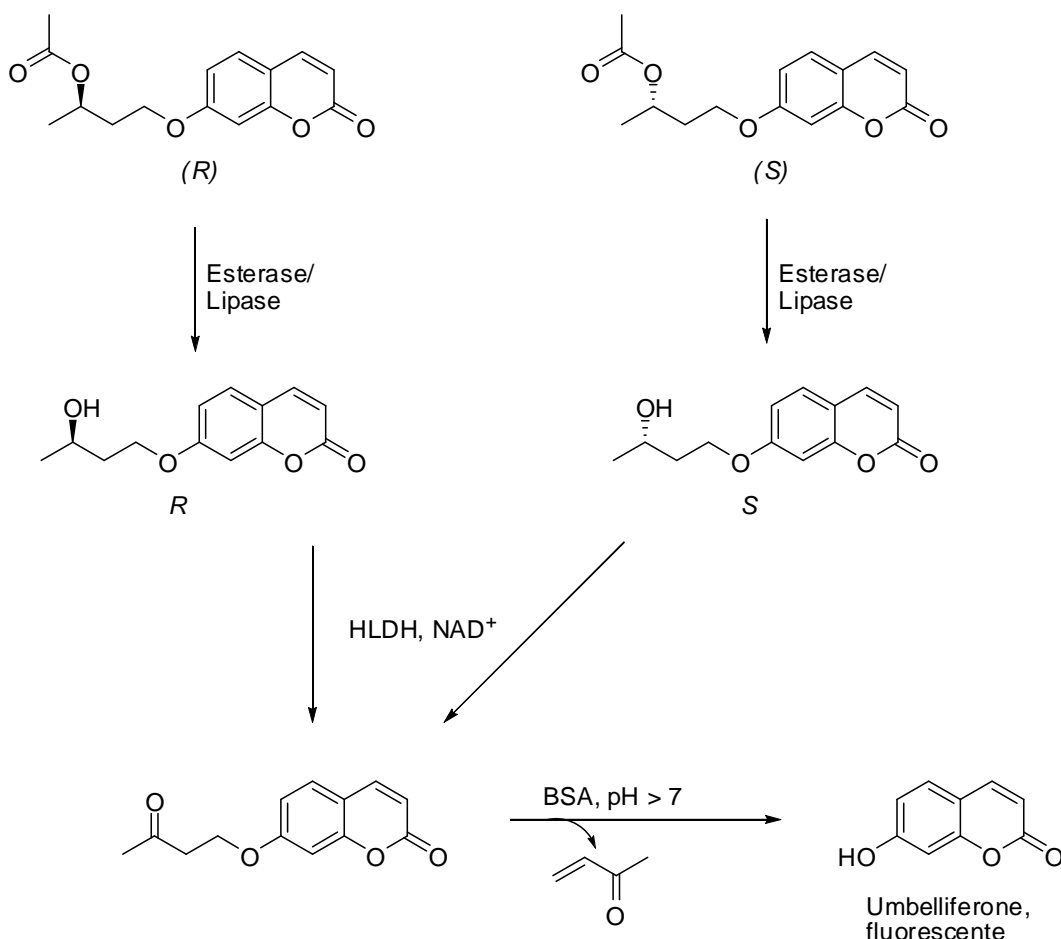


Schéma 8. Hydrolyse énantiosélective des acétates, oxydation de l'alcool et libération d'umbelliférone

Dans un premier temps, l'ester est hydrolysé par une lipase ou une estérase pour fournir l'alcool correspondant qui, ensuite est soumis à une oxydation en présence de l'alcool déshydrogénase de foie de cheval (HLDH) et de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺). La cétone résultante, une fois mise en présence d'albumine bovine (BSA), à pH basique, subit une β-élimination pour libérer l'umbelliférone, produit fluorescent.

Le rapport entre les vitesses des deux réactions menées en parallèle sur les substrats (S) et (R)-esters permet de calculer l'énantiosélectivité des enzymes testées pour la réaction donnée.

Cette méthode présente aussi l'avantage d'être très sensible, selon les auteurs une concentration de seulement 10 µg/mL de substrat par échantillon étant suffisante pour avoir une mesure fiable. En revanche, cette méthode nécessite la synthèse des deux substrats chiraux dont les hydrolyses doivent être menées séparément.

Une stratégie plus intéressante consiste à détecter les deux énantiomères d'un composé au sein d'un mélange grâce à des molécules senseurs capables de discriminer les deux énantiomères

d'un produit chiral. Le premier exemple de ce type de senseur a été décrit en 1996²⁵ mais n'a pas été pour le moment utilisé pour le criblage de catalyseurs asymétriques.

Ce senseur optique, à base de calixarène fonctionnalisée, a la particularité de présenter des spectres d'absorption différents dans le visible, en présence de l'énantiomère *R* ou *S* d'un aminoalcool/amino acide.

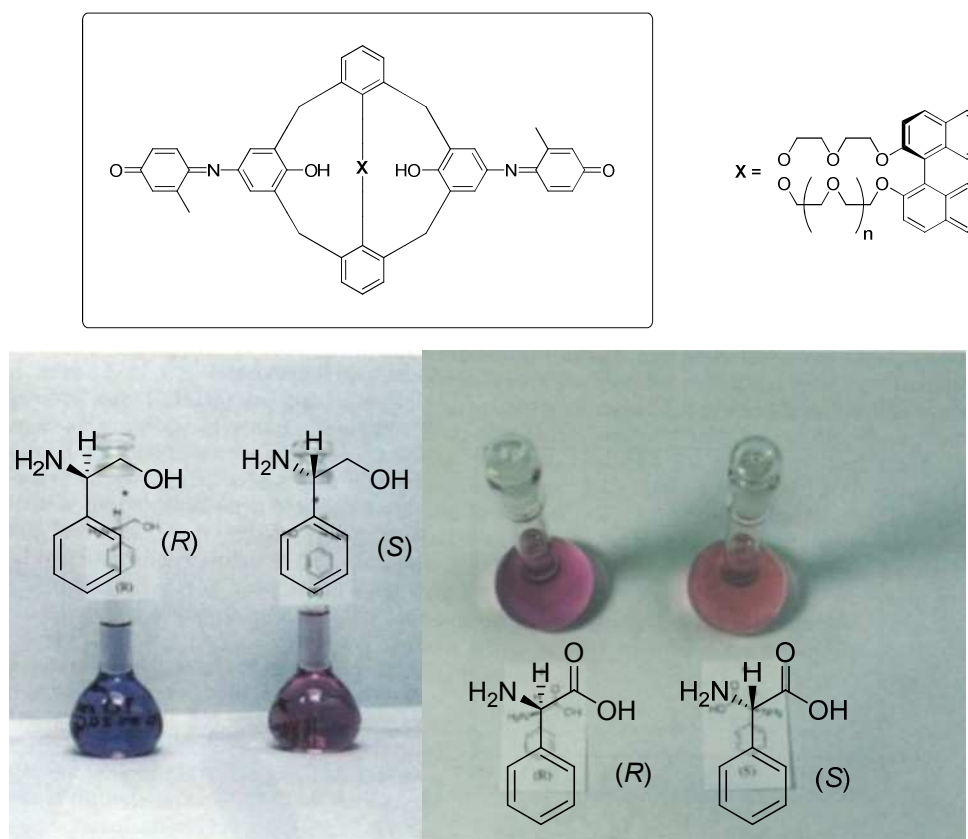


Figure 8. Senseur colorimétrique en présence de l'énantiomère *R* ou *S* d'un aminoalcool (à gauche) et le même senseur colorimétrique en présence de l'énantiomère *R* ou *S* d'un aminoacide (à droite).

Ainsi le senseur optique qui à l'état pur est coloré en rouge présente une bande d'absorption à 515,5 nm, mis en présence du (*R*)-phénylglycinol change de couleur pour devenir bleu violet, entraînant un déplacement de 23 nm de la bande à 515,5 nm et l'apparition d'une nouvelle bande d'absorption à 652 nm. Par contre, si l'énantiomère (*S*) du phénylglycinol est additionné, même à des concentrations importantes, aucune modification dans le spectre d'absorption n'a lieu et la solution reste rouge. Ceci démontre qu'il est possible de concevoir un test de criblage à haut débit basé sur une telle méthode colorimétrique, test capable d'indiquer l'énantiosélectivité d'une réaction.

²⁵ Y. Kubo, S. Maeda, S. Tokita, M. Kubo, *Nature* **1996**, 382, 522.

En s'inspirant du travail décrit plus haut ainsi que d'un autre article publié ultérieurement²⁶, une équipe de l'Université de Virginie aux Etats-Unis a conçu un nouveau senseur chiral fluorescent capable de discriminer les deux énantiomères d'un α -hydroxy acide²⁷.

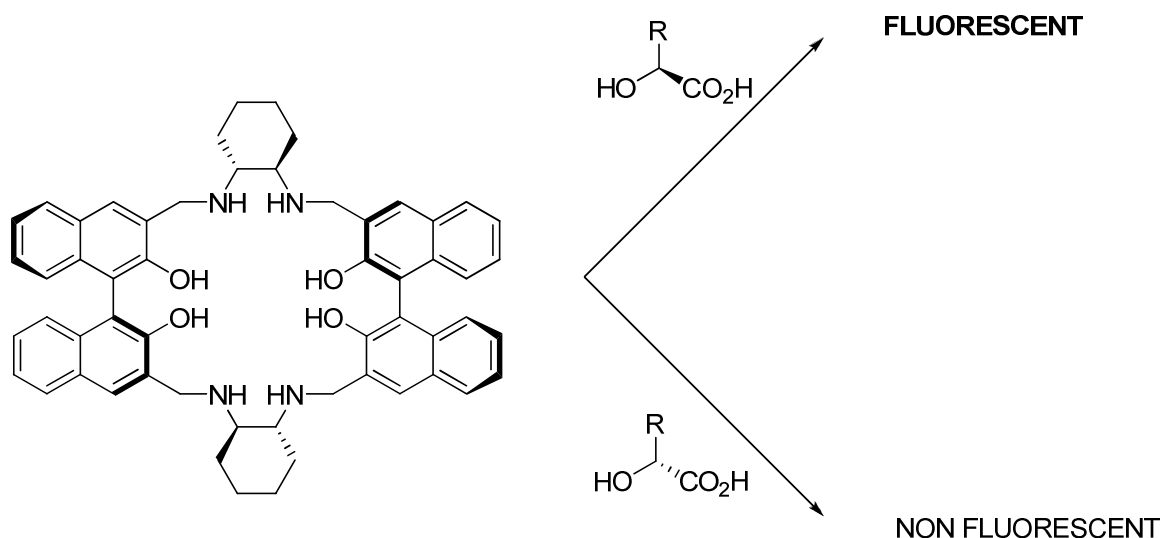


Schéma 9. Structure du macrocycle synthétisé par L. Pu

Ce senseur chiral macrocyclique, issu du couplage de deux molécules de BINOL avec deux molécules de 1,2-dicyclohexyléthylènediamine a la particularité d'augmenter de façon significative l'intensité de son émission en fluorescence lorsqu'il est mis en présence d'un énantiomère de l'acide mandélique. L'énantiomère *S* du senseur augmente son émission seulement en présence du acide (*S*)-mandélique tandis que l'énantiomère *R* ne détecte que le acide (*R*)-mandélique.

Cette reconnaissance chirale sélective a aussi permis aux auteurs de tracer la courbe de l'augmentation de la fluorescence en fonction de la concentration en analyte. Des études complémentaires ont montré que le signal fluorescent est bien proportionnel à la concentration en un énantiomère.

La même équipe a mis au point un système similaire capable de discriminer les deux énantiomères des dérivés acides α -aminés²⁸.

²⁶ Y. Kubo, *Synlett* **1999**, 2, 161.

²⁷ Z.-B. Li, J. Lin, L. Pu, *Angew. Chem. Intl. Ed. Engl.* **2005**, 44, 1690.

²⁸ J. Lin, Z.-B. Li, H.-C. Zhang, L. Pu, *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 103.

Ces études, basés sur l'utilisation des senseurs chiraux montrent qu'il est possible, de concevoir un test de criblage à haut débit permettant d'accéder aux valeurs de *ee* dans divers mélanges d'énantiomères.

II.3. Criblage de catalyseurs par thermographie infrarouge

La thermographie infrarouge peut être utilisée pour réaliser le criblage d'un grand nombre de réactions chimiques énantiosélectives comme le montre une étude publiée en 1998²⁹. Le principe du test est basé sur le fait que pour une réaction chimique exothermique donnée, le dégagement de chaleur en présence d'un catalyseur efficace sera plus rapide que dans le cas de la réaction non catalysée.

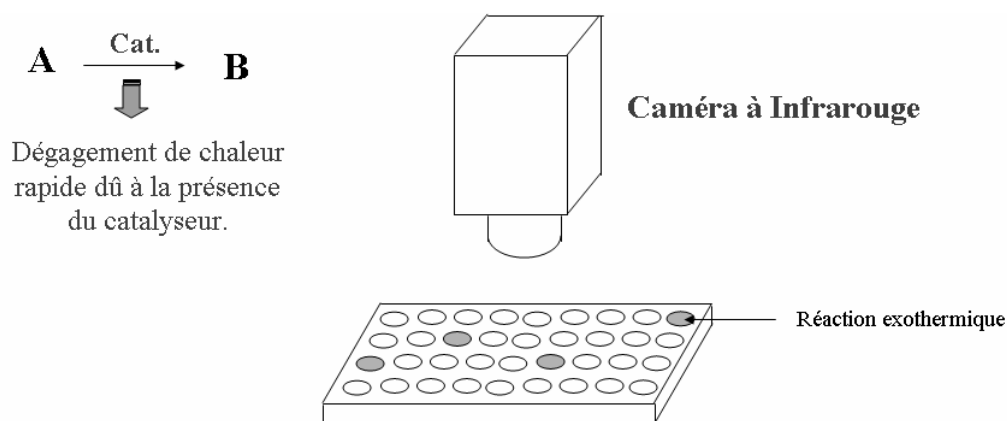


Figure 9. Principe de la méthode thermographique

La réaction modèle est l'acylation énantiosélective du 1-phényléthanol par l'acétate de vinyle, catalysée par les lipases. Il est connu que cette transformation se fait avec une sélectivité de 99% en faveur de l'énantiomère *R* en présence de la lipase de *Candida antarctica*.

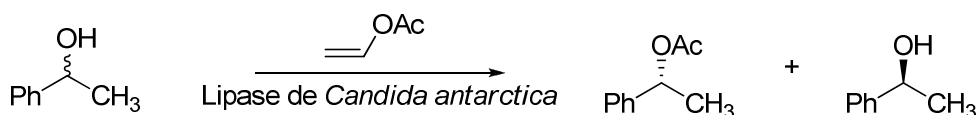


Schéma 10. Acylation du 1-phényléthanol en présence de lipase de *Candida antarctica*

²⁹ M.T. Reetz, M.H. Becker, K.M. Kühling, A. Holzwarth, *Angew. Chem. Intl. Ed. Engl.* **1998**, 37, 2647.

Les réactions sont effectuées en absence et en présence de l'enzyme sur le mélange racémique ainsi que sur les produits de départ énantiopurs. La figure suivante montre les expériences réalisées en absence d'enzyme à $t = 0$ et à $t = 3,5$ min respectivement et l'expérience en présence d'enzyme ou on voit clairement un dégagement thermique relativement important dans les puits correspondant au énantiomère (*R*) du produit de départ, un dégagement moins important pour le racémique et quasi nul pour le (*S*). Ainsi, il est évident que l'énantiomère (*R*) réagit beaucoup plus vite que le (*S*), et par conséquent en déduire l'énantiosélectivité de l'enzyme pour l'énantiomère (*R*) du substrat.

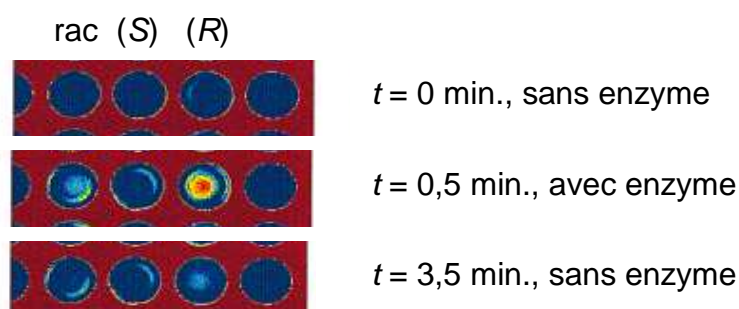


Figure 10. Image thermographique des plaques de catalyse.

L'avantage de cette méthode est sa grande capacité de criblage et sa généralité, toute réaction exothermique pouvant être criblée par cette méthode. Par contre son inconvénient réside dans son incapacité à quantifier l'excès énantiomérique pour une réaction.

II.4. Tests basés sur l'électrophorèse capillaire

En partant de l'idée que l'usage des cyclodextrines comme phases pseudostationnaires en électrophorèse capillaire peut conduire à la séparation chirale des deux énantiomères d'un produit, M.T. Reetz³⁰ a mis au point un système de criblage ultra rapide des réactions catalytiques énantiosélectives ayant un débit (non optimisé) d'environ 7000 déterminations de *ee* par jour. Selon les auteurs, après optimisation ce système aurait la possibilité de cribler entre 15000 et 30000 catalyses par jour. Les catalyses sont réalisées en plaques format 96 puits et l'électrophorèse est entièrement automatisée et utilise un système MegaBase.

³⁰ M.T. Reetz, K.M. Kühling, A. Deege, H. Hinrichs, D. Belder, *Angew. Chem. Intl. Ed. Engl.* **2000**, 39, 3891.

La synthèse énantiosélective d'amines chirales a été choisie comme réaction modèle (schéma 11).

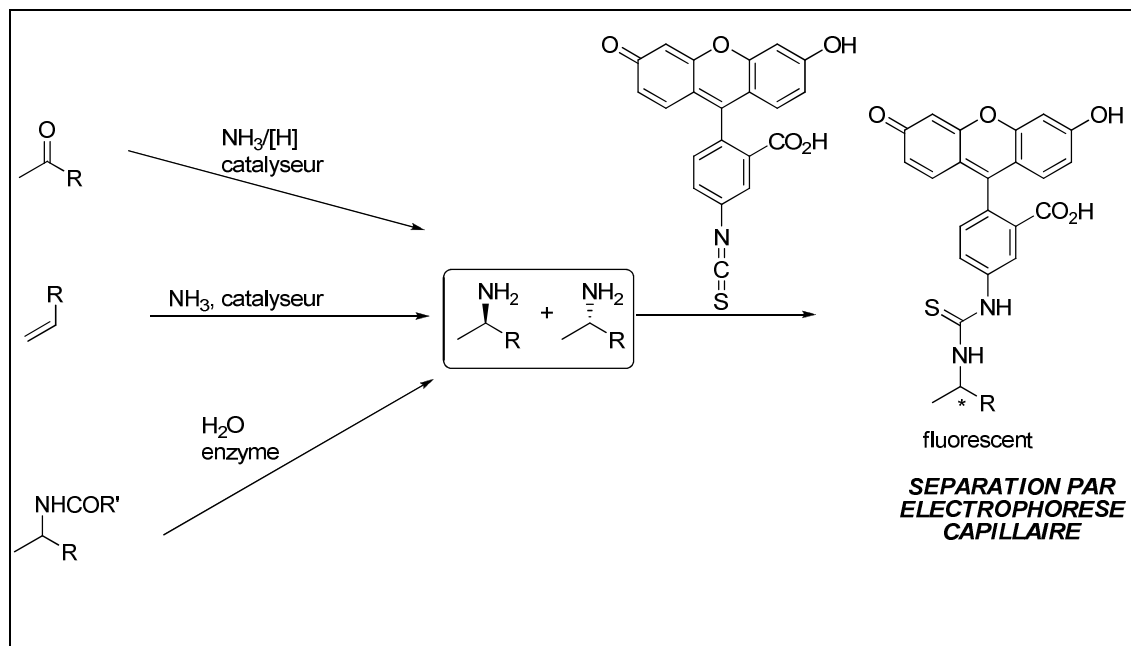


Schéma 11. Voies de synthèse énantiosélective des amines chirales

Afin de pouvoir détecter les molécules par fluorescence induite par laser, les amines sont couplées avec l'isothiocyanate de fluorescéine. Dans la figure suivante est présentée la séparation par électrophorèse capillaire de quelques types d'amines chirales couplés à l'isothiocyanate de fluorescéine.

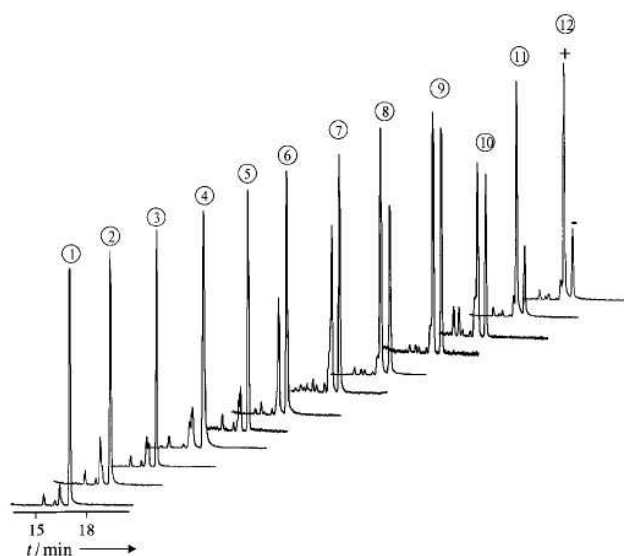


Figure 11. Exemple de séparation chirale des énantiomères d'une amine chirale par électrophorèse capillaire

La mesure des *ee* par cette méthode peut se réaliser avec un débit impressionnant, ce qui fait de ce procédé un des plus rapides disponibles actuellement.

II.5. Tests basés sur la spectrométrie de masse

Plusieurs méthodes de détermination de l'excès énantiomérique à l'aide de la spectrométrie de masse ont été publiées dans la littérature³¹ mais nous ne détaillerons ici que la méthode de criblage publiée par M.T. Reetz³². Ce procédé, basé sur un concept énoncé par A. Horeau dans les années 1990³³, permet de réaliser jusqu'à 1000 mesures de *ee* par jour et, selon les auteurs, cette méthode serait applicable pour la résolution des mélanges racémiques. Pour exemplifier, M.T. Reetz applique ce procédé à la résolution cinétique de l'acide 1-phényl-éthylacétique réalisée par les lipases.

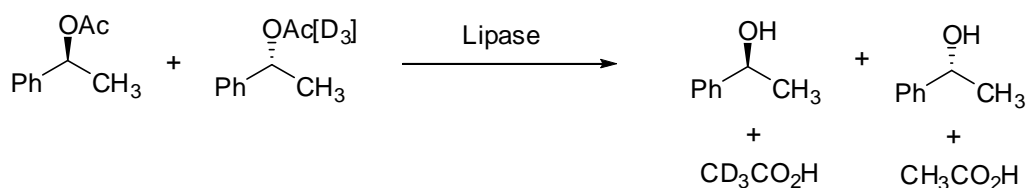


Schéma 12. Résolution cinétique des pseudo-énantiomères

A la fin de la réaction l'analyse par spectrométrie de masse permet de mesurer les intensités relatives des pseudoénantiomères de départ résiduels ainsi que le rapport des intensités relatives de l'acide acétique et de l'acide acétique deutéré, ce qui conduit à la valeur de l'excès énantiomérique.

³¹ a) J.H. Guo, J.Y. Wu, G. Siuzdak, M.G. Finn, *Angew. Chem. Intl. Ed. Engl.* **1999**, 38, 1755; b) W. Schrader, A. Eipper, D.J. Pugh, M.T. Reetz, *Can. J. Chem.*, **2002**, 80, 626.

³² M.T. Reetz, M.H. Becker, H.-W. Klein, D. Stöckigt, *Angew. Chem. Intl. Ed. Engl.* **1999**, 38, 1758.

³³ A. Horeau, A. Nouaille, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 2707.

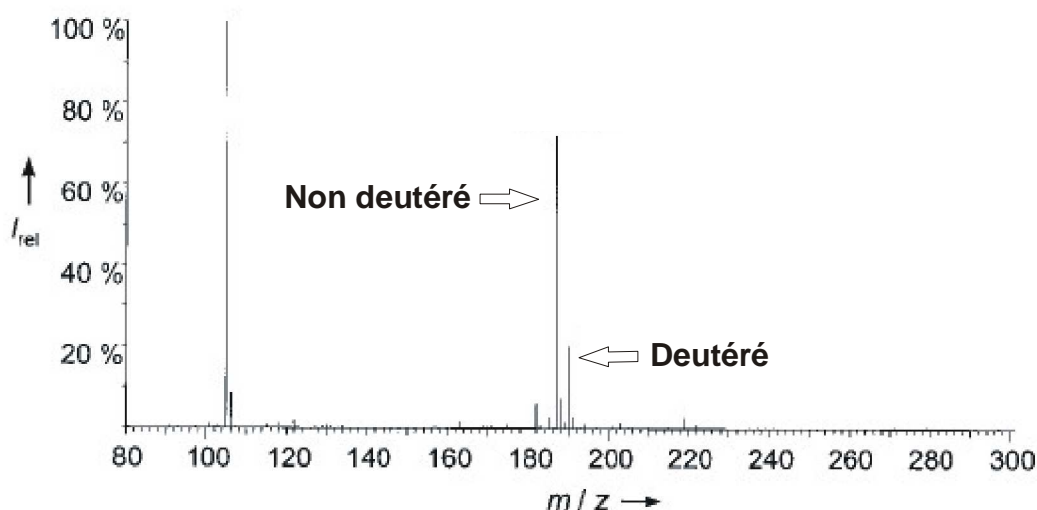


Figure 12. Spectre de masse des deux produits de départ (pseudo-énantiomères)

L'inconvénient de ce procédé serait la nécessité de préparer les substrats pseudo-énantiomères, mais, une fois cette étape accomplie, la méthode permet un criblage rapide et efficace des biocatalyseurs ou des catalyseurs chimiques. Cette méthode ne peut pas non plus être utilisée dans le cas des substrats prochiraux.

II.6. Tests enzymatiques (EMDee³⁴)

Pour faire du criblage de catalyseurs pour les réactions énantiosélectives, plusieurs méthodes enzymatiques d'évaluation de l'*ee* ont été développées. Ici nous n'allons présenter brièvement qu'une seule³⁵ de ces techniques, adaptée à la réaction d'addition énantiosélective du diethylzinc sur le benzaldéhyde.

³⁴ *Enzymatic method for determining enantiomeric excess*

³⁵ P. Abato, C. Seto, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 9206.

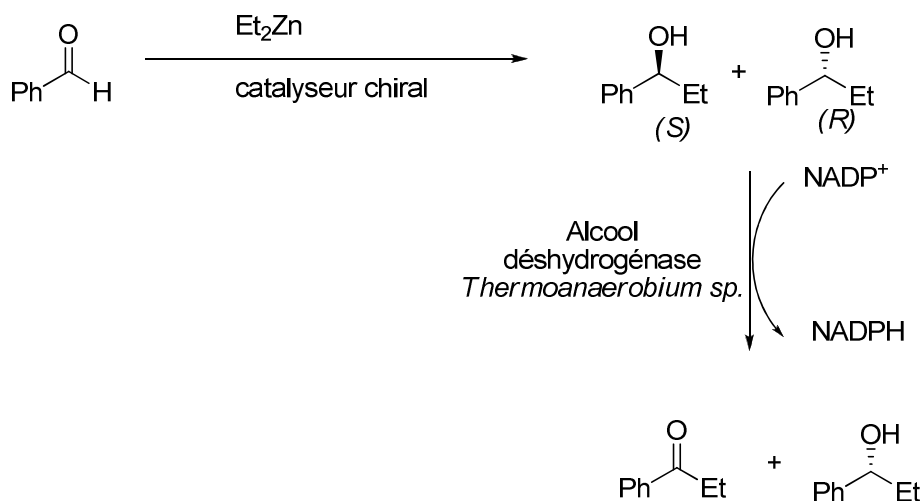


Schéma 13. Principe de la méthode EMDee

Pour la détection des deux énantiomères résultants de cette réaction l'alcool déshydrogénase du *Thermoanaerobium sp.* est utilisée comme enzyme et le NADP^+ comme oxydant. La cinétique de l'oxydation peut être estimée en suivant, par spectroscopie UV, la formation de NADPH ($\lambda = 340 \text{ nm}$). L'énantiomère (S) de l'alcool est un bon substrat pour l'enzyme ($K_M = 6,4 \pm 1,1 \text{ mM}$), tandis que le (R) en est un inhibiteur ($K_i = 6,0 \pm 1,5 \text{ mM}$). L'équation de Michaelis-Menten fournit une corrélation directe entre la vitesse de cette réaction et les concentrations respectives des deux énantiomères de l'alcool.

Expérimentalement, chaque brut réactionnel est dilué dans un mélange contenant l'enzyme et son co-facteur (NADP^+) puis la vitesse d'oxydation enzymatique est déterminée. Selon C.T. Seto, ce type de test est adaptable facilement en format plaque 384 puits et, pour une centaine de réactions, le temps d'analyse nécessaire serait de 30 minutes seulement.

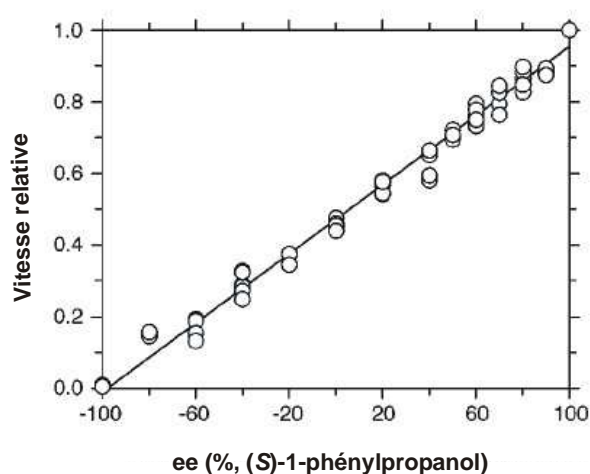


Figure 13. Relation entre la vitesse d'oxydation enzymatique et l'excès énantiomérique des échantillons

Ce type de méthode enzymatique a aussi été adapté pour les réactions d'hydrolyse enzymatique asymétrique de l' α -phénylethylacétate³⁶, l'hydrolyse enzymatique asymétrique d'un acétate allylique³⁷ et pour l'oxydation énantiosélective des thioéthers en présence d'isopropylate de titane (IV)/tartrate/hydroperoxyde de cumène³⁸.

Les réactions pouvant être criblées par cette méthode sont toutefois limitées puisqu'il est nécessaire de disposer à chaque fois d'une enzyme particulière dont la mesure de l'activité puisse se faire simplement.

Comme nous venons de le voir, il existe de nombreuses méthodes de criblage décrites dans la littérature. Les concepts de ces techniques et leurs performances sont très variés. Plusieurs méthodes alternatives que nous ne présenterons pas dans ce chapitre sont décrites dans la littérature³⁹.

³⁶ M. Baumann, R. Stürmer, U.T. Bornscheuer, *Angew. Chem. Intl. Ed. Engl.* **2001**, 40, 4201.

³⁷ M.B. Onaran, C.T. Seto, *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 8136.

³⁸ C.M. Sprout, C.T. Seto, *Org. Lett.* **2005**, 22, 5099.

³⁹ a) M.T. Reetz, A. Eipper, P. Tielmann, R. Mynott, *Adv. Synth. Catal.* **2002**, 334, 1008 (spectroscopie de RMN); b) G. Klein, J.L. Reymond, *Angew. Chem. Intl. Ed.* **2001**, 40, 1771 (systèmes bases sur des chélateurs des métaux comme quenchers de la fluorescence), c) G.T. Copeland, S.J. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 6496 (fluorophores sensibles au pH), d) E.R. Jarvo, C.A. Evans, G.T. Copeland, S.J. Miller, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 5522; e) G. A. Korbel, G. Lalic, M.D. Shair, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 361 (reaction microarrays).

III. Objectifs de la thèse

Comme nous venons de le voir dans les paragraphes précédents, la méthode la plus efficace pour la découverte de nouveaux catalyseurs repose sur le criblage à haut débit. Même si dans la littérature un certain nombre de tests à haut débit ont permis l'identification de systèmes catalytiques innovants, ces techniques sont soit incomplètes (ex. incapacité de déterminer le rendement chimique d'une réaction) soit trop onéreuses ou difficiles à mettre en œuvre.

Dans ce manuscrit nous nous proposons de présenter la mise en œuvre d'une nouvelle technique de criblage à haut débit basée sur des méthodes utilisées en immunologie. Cette technique sera appliquée à la découverte de nouveaux systèmes catalytiques pour des transformations énantiosélectives et pour des réactions de couplage.

Dans la première partie du manuscrit nous allons présenter deux versions du test immunoenzymatique adapté pour les réactions stéréosélectives, une faisant appel aux anticorps monoclonaux énantiosélectifs, et une deuxième utilisant des anticorps polyclonaux énantiosélectifs, facile à mettre en œuvre, rapide et surtout moins onéreuse que la précédente.

Dans la dernière partie du manuscrit nous allons décrire une méthode immunométrique capable de réaliser le criblage à haut débit de réactions de couplage.

Ces techniques développées au laboratoire ont la particularité d'être capable de réaliser le criblage à haut débit dans un temps court pour un grand nombre de systèmes catalytiques (théoriquement on peut atteindre l'analyse de 1000 échantillons par jour) et présente l'avantage de permettre, dans le cas des transformations énantiosélectives, d'accéder à la valeur du rendement chimique et de l'excès énantiomérique.

Basés sur les résultats obtenus dans notre laboratoire, nos recherches ont consisté à démontrer que les techniques immunoanalytiques, basées sur l'utilisation des anticorps spécifiques peuvent également être des méthodes de choix dans le cadre du criblage de catalyseurs. Avant de rentrer dans le vif du sujet il convient de rappeler quelques notions d'immunologie.

Chapitre 1. Généralités sur les dosages immunologiques⁴⁰

I. Le système immunitaire et la structure des anticorps

I.1. Structure

Le rôle du système immunitaire est de protéger l'organisme contre les agressions extérieures. Lorsqu'une molécule ou un organisme étranger pénètre dans le corps notre système immunitaire génère une réponse par l'intermédiaire des leucocytes produits par les cellules souches au sein de la moelle osseuse. Lors de cette réponse immunitaire les lymphocytes produisent des *anticorps*, entités dirigées spécifiquement contre la structure étrangère. Cette structure (molécule, virus etc.) capable de générer une réponse immunitaire porte le nom d'*antigène*.

Selon la structure proposée par G.M. Edelman en 1973⁴¹, les anticorps sont des immunoglobulines constituées de chaînes lourdes « H » (*heavy*) et de chaînes légères « L » (*light*). Ces chaînes lourdes sont unies entre elles par au moins deux ponts disulfures intercaténaires. Chaque anticorps comporte des régions constantes (C) et des régions variables (V). Les régions variables sont propres à chaque anticorps tandis que les régions constantes sont semblables pour toutes les immunoglobulines d'une classe donnée. Dans les régions variables se trouve une région dite hypervariable correspondant au site de liaison de l'antigène. Les chaînes lourdes différencient les cinq classes d'immunoglobulines. La figure 14 présente la structure des immunoglobulines G qui seront utilisées tout au long de ce travail de thèse.

⁴⁰ R. Bador, Y. Barbier, H. Bonnet, A. Charrié, G. Charrière, R. Cohen, H. Dechaud, D. Hartmann, B. Krebs, S. Grillet, Y. Lasne, M.J. Latapie, G. Ville, *Les Immunodosages de la théorie à la pratique*, Ed. de l'ACOMEN, Oullins, **1990**.

⁴¹ G.M. Edelman, *Science* **1973**, 180, 830.

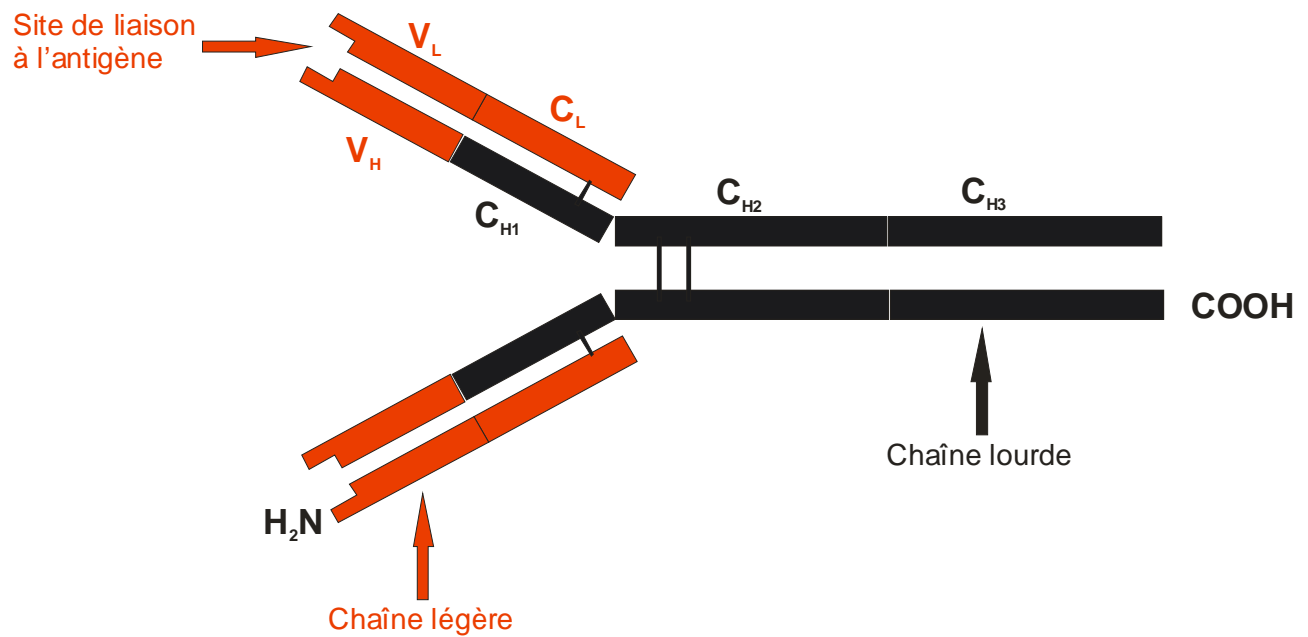


Figure 14. Structure de base d'une immunoglobuline G

I.2. Production des anticorps

Selon la théorie la plus couramment admise aujourd'hui, la production d'anticorps débute par la fixation spécifique de l'antigène sur les lymphocytes B capables de le reconnaître, ce qui induit leur prolifération, puis leur transformation en plasmocytes et ensuite la production et la libération d'immunoglobulines spécifiques dans le milieu extracellulaire.⁴²

I.2.1. Anticorps polyclonaux

Lorsque un immunosérum contient plusieurs types d'anticorps dirigés contre différents haptènes (ou différents épitopes du même antigène), il porte le nom de *sérum polyclonal*. Pour l'obtention d'un sérum, des injections d'antigènes sont faites à un animal. Un certain temps après l'inoculation, appelé période de latence, des anticorps sont produits. Si une deuxième injection d'antigène a lieu, la réponse est beaucoup plus intense et de meilleure qualité.

Les techniques d'obtention d'un anticorps les techniques restent encore très empiriques et il n'existe pas pour l'instant de recette universelle. Le résultat d'une immunisation dépend

⁴² I. Roitt, J. Brostoff, D. Male, *Immunologie fondamentale et appliquée*, Medsi, Paris, **1985**.

largement de plusieurs facteurs : l'espèce animale, la nature de l'antigène, l'association ou non de plusieurs antigènes, l'utilisation d'adjuvants, la voie d'administration, la dose injectée, et la séquence des injections.

On distingue deux types d'antigènes : les antigènes spontanément immunogènes et les *haptènes*. Les haptènes sont de petites molécules qui ne provoquent aucune réponse immunitaire sauf s'ils sont couplés à une protéine porteuse de poids moléculaire important. Les molécules ayant une masse inférieure à 1000 ne produisent aucune réponse immunitaire tandis que les molécules dont la masse est comprise entre 1000 et 5000 induisent des réactions variables.

Ainsi, pour obtenir une réponse immunitaire contre une petite molécule il faut absolument la coupler à une protéine pour obtenir ce que l'on appelle un immunogène conjugué. Les protéines les plus utilisées comme porteur en immunologie sont l'albumine bovine (BSA, facile à obtenir), la thyroglobuline (très immunogène) et l'hémocyanine de patelle (KLH).

Les méthodes de couplage haptène protéine font appel à des réactions chimiques robustes, telles que le couplage peptidique à l'aide des carbodiimides⁴³, le couplage de deux fonctions amines en utilisant le toluène 2,4-diisocyanate⁴⁴, le couplage peptidique au moyen d'anhydride mixte⁴⁵, le couplage au moyen d'un sel de diazonium⁴⁶ ou le couplage au moyen du glutaraldéhyde⁴⁷.

La technique d'immunisation proprement dite consiste à injecter une préparation antigénique en plusieurs sites par voie intradermique. Les injections sont répétées plusieurs fois (1-2 fois/mois) et, après trois ou quatre mois, du sang est prélevé pour tester la production d'anticorps. Si la concentration (le titre) d'anticorps spécifiques est insuffisante, les injections sont poursuivies. Dès que le titre envisagé est atteint, on effectue un prélèvement massif du sang de l'animal.

Caractérisation d'un immunosérum

Un immunosérum est un réactif qui est caractérisé par trois paramètres : **le titre** (la dilution pour laquelle on observe 50% de liaison de l'antigène marqué), **l'affinité** (la mesure de la constante d'association K_a en mol/L) et **la spécificité** (la capacité de l'anticorps à ne reconnaître

⁴³ a) J.C. Sheenan, G.P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 1067; H.G. Khorana, *Chem. Ind.* **1955**, 1087.

⁴⁴ a) A.F. Schick, S.J. Singer, *J. Biol. Chem.* **1961**, 236, 2477; b) D.H. Clyne, S.H. Norris, R.M. Modesto, A.J. Pescle, V.E. Pollak, *J. Histochem. Cytochem.* **1973**, 21, 233.

⁴⁵ B.F. Erlanger, F. Borek, S.M. Beiser, S. Lieberman, *J. Biol. Chem.* **1957**, 228, 713.

⁴⁶ P. Mojaverian, G.D. Chase, *J. Pharm. Sci.* **1980**, 69, 721.

⁴⁷ T. Ternynck, S. Avrameas, *Techniques immunoenzymatiques*, Ed. INSERM, Paris, **1987**.

que l'antigène contre lequel il a été dirigé). Sachant qu'un immunosérum polyclonal est constitué de plusieurs anticorps dirigés contre différents antigènes ou différents épitopes du même antigène, on peut, dans certains cas observer des « **réactions croisées** ». Ce sont des interactions qui se produisent entre l'anticorps et des molécules de structure différente de l'antigène. On peut estimer cette « non-spécificité » de l'immunosérum par le pourcentage de réactions croisées correspondant au rapport d'affinité en pourcentages de l'immunosérum pour deux composés.

I.2.2. Anticorps monoclonaux

Selon la théorie de la sélection clonale chaque lymphocyte B ne reconnaît qu'un seul déterminant antigénique d'antigène et par conséquent n'exprime qu'un seul type d'anticorps⁴⁸. Ce type d'immunoglobuline, produit par une cellule reconnaissant spécifiquement un antigène ou par une cellule « mémoire » à vie longue est nommé *anticorps monoclonal*. C'est en 1975 que les anticorps monoclonaux ont été obtenus *in vitro* pour la première fois⁴⁹. Les cellules de certains myélomes de souris ont la propriété de se multiplier *in vitro* en donnant des clones immortels, à la différence des lymphocytes. En fusionnant une telle cellule myéломateuse et un lymphocyte B d'une souris immunisée, des cellules hybrides ou hybridomes sont obtenus. Cette cellule porte les caractéristiques des cellules mères : elle possède la spécificité du lymphocyte B et la malignité du myélome (capacité de se reproduire indéfiniment et rapidement).

Après cette étape de fusion cellulaire s'en suit une étape de dilution limite des hybridomes de manière à n'avoir statistiquement qu'une cellule par puits, celle-ci prolifère sur milieu de culture pour former un clone de cellule ne produisant qu'un seul type d'anticorps (figure 15).

Les anticorps monoclonaux produits par ces cellules sont homogènes de point de vue moléculaire et ont une monospécificité pour un épitope donné.

⁴⁸ F. M. Burnet, *Aust. J. Sci.* **1957**, 20, 67.

⁴⁹ G. Köhler, C. Milstein, *Nature* **1975**, 256, 495.

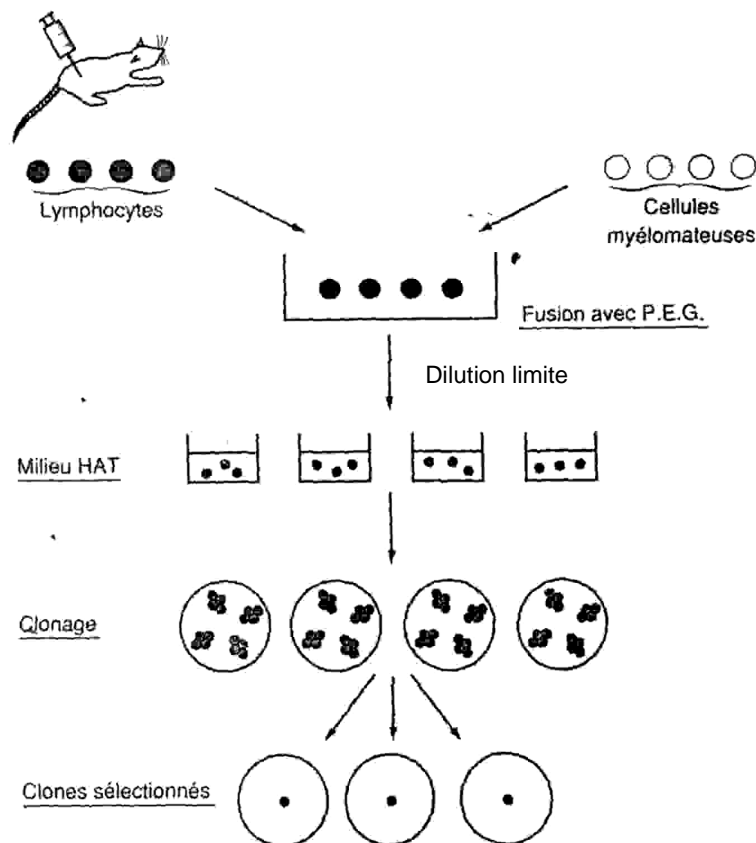


Figure 15. Principe de préparation des anticorps monoclonaux

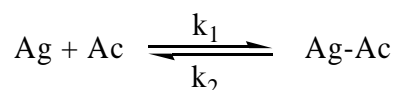
II. Principaux types de dosage immunologique

II.1. Interaction anticorps-antigène⁵⁰

Les interactions entre les anticorps et les antigènes sont de nature non covalente et ne conduisent jamais à la modification définitive ni de l'un ni de l'autre. Ce sont des interactions de type hydrogène, ioniques, van der Waals ou hydrophobes, faibles individuellement mais fortes dans l'ensemble.

Pour la réaction entre un anticorps et un antigène on peut écrire l'équation suivante :

⁵⁰ a) M.W. Steward, J. Steensgaard, *Antibody affinity : thermodynamic aspects and biological significance*, CRC Press, **1983**; b) J.F. Bach, *Immunologie*, Flammarion, **1986**



ou Ac représente l'anticorps, Ag l'antigène libre et Ag-Ac le complexe antigène anticorps, k_1 et k_2 étant respectivement les constantes de vitesse d'association et de dissociation.

Cette réaction étant réversible, à l'équilibre la quantité de complexe antigène anticorps est égale à la quantité du même complexe dissocié par unité de temps, phénomène décrit par l'équation :

$$\frac{d[\text{Ag} - \text{Ac}]}{dt} = k_1[\text{Ag}][\text{Ac}] - k_2[\text{Ag} - \text{Ac}]$$

Par conséquent, à l'équilibre

$$\frac{d[\text{Ag} - \text{Ac}]}{dt} = 0 \text{ ou } k_1[\text{Ag}][\text{Ac}] = k_2[\text{Ag} - \text{Ac}] \text{ et } \frac{k_1}{k_2} = \frac{[\text{Ag} - \text{Ac}]}{[\text{Ag}][\text{Ac}]} = K_a$$

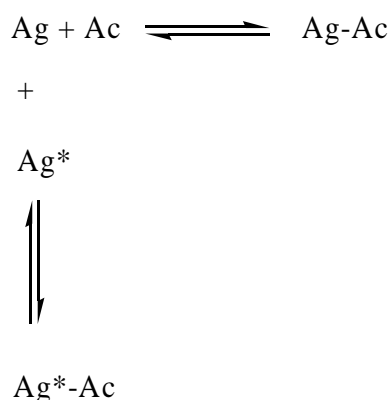
où K_a (unité L/mol) est la constante d'association à l'équilibre (appelée aussi constante d'association intrinsèque). $(K_a)^{-1} = K_d$ (mol/L) qui est la constante de dissociation à l'équilibre.

Il existe des nombreuses méthodes de dosage immunologique⁵¹. Toutes ces méthodes peuvent être classées en deux groupes, selon les proportions relatives d'anticorps et d'antigène mises en jeu. La première classe de méthodes comporte les techniques dites « en défaut d'anticorps » ou *méthodes par compétition* tandis que de la deuxième classe font partie les méthodes « en excès d'anticorps », comme la méthode appelée « *sandwich* ».

⁵¹ L. Wide, *Principles of competitive protein-binding assay*, Odell W.D., Franchimont P. Ed., John Wiley & Sons, New York, **1983**.

II.2. Méthodes par compétition⁵²

Si l'on met en présence un antigène Ag, ce même antigène « marqué » Ag* et un anticorps dirigé contre cet antigène Ac, et, si $[Ac] < [Ag^*]$ une compétition vis-à-vis des sites anticorps, comme décrit dans l'équation suivante, s'établit.



Si les concentrations en anticorps $[Ac]$ et en antigène marqué $[Ag^*]$ sont fixes, l'augmentation de la concentration en antigène $[Ag]$ va déterminer le déplacement de l'équilibre vers la formation du complexe antigène anticorps $[Ag-Ac]$.

En partant des solutions de concentrations connues en antigène, on peut tracer une *courbe d'étalonnage*, qui relie la concentration mesurée en complexe $[Ac-Ag^*]$ à $[Ag]$. En utilisant cette courbe d'étalonnage il nous est possible de déterminer la concentration en antigène Ag dans des milieux de concentration inconnue. Cette courbe d'étalonnage (figure 16) est une représentation semi logarithmique qui utilise en abscisse le logarithme de la concentration initiale en antigène $[Ag]$ et en ordonnée le rapport B/B_0 qui est caractéristique pour le complexe Ac-Ag*. B_0 représente la concentration en complexe Ac-Ag* en absence de Ag et B la concentration en Ac-Ag* en présence de Ag.

⁵² a) R.S. Yallow, S.A. Berson, *Principles of competitive protein-binding assays*, Odell W.D., Daughaday W.H. Ed., Lippincott Philadelphia, **1971**; b) R.P. Ekins, G.B. Newman, J.L.H. O'Riordan, *Statistics in Endocrinology*, J.S. Mc Arthur, T. Colton Ed., MIT Press, **1970**; c) W.H.C. Walker, P.M. Keane, *Handbook of Radioimmunoassay*, Abraham G. Ed., Marcel Dekker, New York, **1977**.

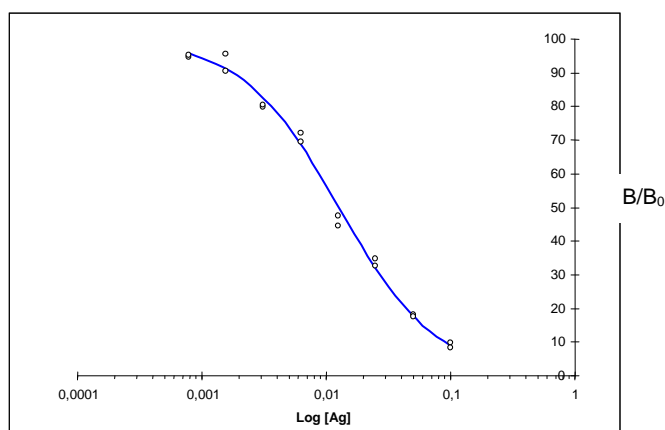


Figure 16. Courbe d'étalonnage pour un dosage par compétition

La sensibilité d'un dosage est exprimée par la concentration minimale détectable en antigène. Cette valeur dépend des caractéristiques de la courbe d'étalonnage et de la précision des mesures au voisinage de B_0 . En pratique, la précision de la mesure du paramètre B_0 est estimée (écart type σ sur une population statistique de 5 à 10 mesures) puis on calcule, en se rapportant à la courbe, la concentration $[Ag]$ correspondant à une mesure de B égale à $B_0 - 3\sigma$ (le taux de confiance du dosage est alors de 99%). Une estimation plus grossière de la sensibilité est donnée par la concentration $[Ag]$ correspondant à une mesure de 50% du paramètre B/B_0 (situé dans la partie linéaire de la courbe sigmoïde), en général il est considéré que le dosage est fiable pour une mesure de B/B_0 comprise entre 20 et 90% sur la courbe d'étalonnage. La valeur de la concentration $[Ag]$ correspondant à B/B_0 50% est relative de l'afinité de l'anticorps pour l'antigène.

Typiquement, pour mettre en œuvre un tel test on utilise des plaques Maxisorb 96 puits sur la surface desquelles l'anticorps monoclonal a été fixé. Dans chaque puits, l'antigène et un antigène conjugué à une enzyme, dans notre cas l'acétylcholine estérase (EC 3.1.1.7) sont ajoutés (étape 1, figure 17). Le choix de cette enzyme est basé sur le fait qu'elle possède une très grande activité catalytique ($k_{cat} = 16000$ molécules/site/sec.), ce qui confère aux conjugués Ag^* une activité spécifique élevée, supérieure ou égale à celle des traceurs radioactifs. L'antigène et l'antigène conjugué (« traceur ») vont entrer en compétition pour occuper les sites de l'anticorps de détection. Après avoir effectué un lavage afin d'éliminer toutes les espèces non liées, (étape 2, figure 17), l'acétylcholineestérase est détectée par la méthode d'Ellman⁵³, utilisant un mélange d'acétylthiocholine (pseudo substrat de l'AChE) et de DTNB (5,5'-dithiobis(acide-2-nitrobenzoïque) (étape 3, figure 17). L'hydrolyse de ce pseudosubstrat catalysée par l'AChE

⁵³ G.L. Ellman, K.D. Courtney, V.Andres, R.M. Featherstone, *Biochem. Pharmacol.*, **1961**, 7, 88.

produit la thiocholine qui réagit avec le DTNB pour former un thiol aromatique (déprotonné dans les conditions de pH utilisées). Ce dernier est un chromophore ($\lambda_{\text{max}} = 414 \text{ nm}$, $\epsilon_{\text{max}} = 13600 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) qui absorbe dans le visible produisant une couleur jaune (schéma 14).

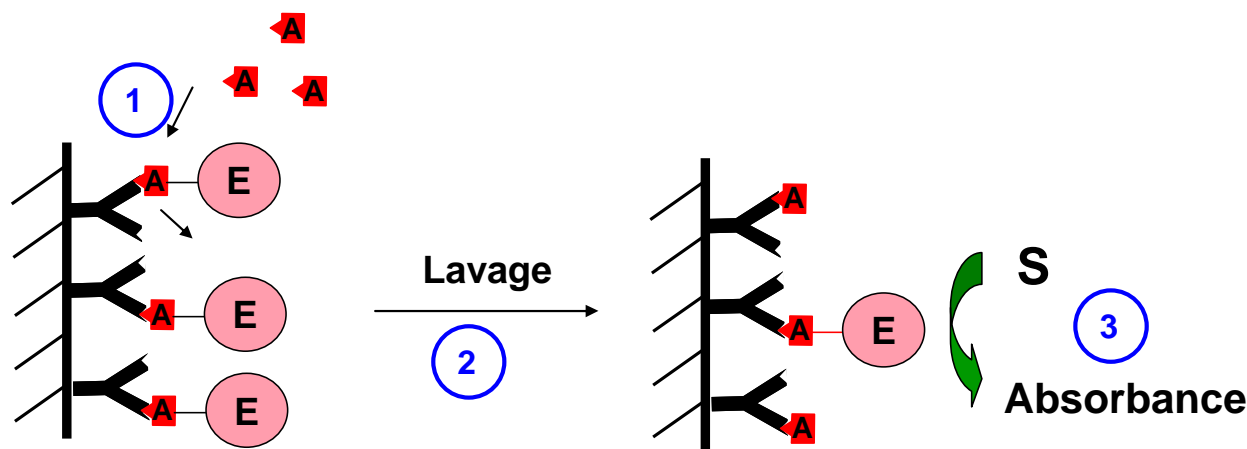


Figure 17. Principe du test par compétition. A = antigène à détecter, E = AChE, S = substrat Ellman

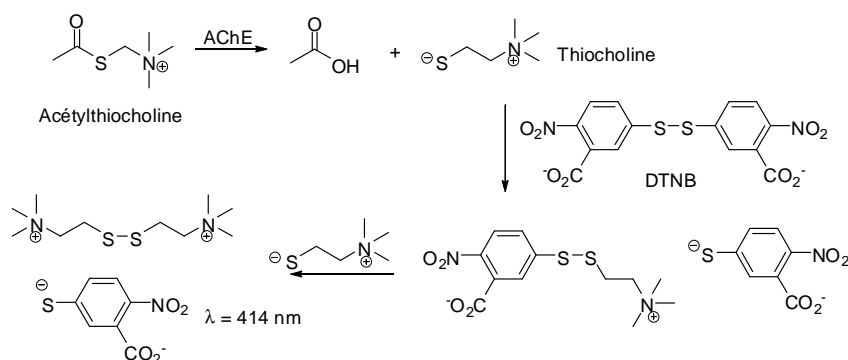


Schéma 14. Principe de la méthode colorimétrique d'Ellman

Cette méthode colorimétrique permet de mesurer les concentrations en AChE qui sont ensuite exprimées en **unités Ellman** (UEll). Une UEll est définie comme étant la quantité d'enzyme produisant un accroissement d'absorbance optique d'une unité à 414 nm pendant une minute, dans un volume de 1 mL de milieu d'Ellman, pour un trajet optique de 1 cm, à 25°C. Une unité Ellman correspond à $7,35 \cdot 10^{-2}$ unités enzymatiques, l'unité enzymatique UE étant définie comme la quantité d'enzyme catalysant l'hydrolyse d'une μmole de substrat pendant une minute à 25°C.

II.3. Méthodes type « sandwich »

La particularité de cette méthode est qu'elle n'est applicable que pour la détection d'un antigène possédant au moins deux épitopes.

Dans le cas de la méthode appelée « sandwich », deux anticorps sont utilisés. Le premier anticorps est fixé à un support solide (anticorps liant) et doit être présent en quantité suffisante pour que le nombre de sites de liaison soit supérieur au nombre de molécules d'antigènes présentes dans les solutions à doser. Après la capture de l'antigène suite à une incubation par ce premier anticorps (étape 1, figure 18), un lavage est effectué (étape 2, figure 18), et le deuxième anticorps (anticorps marqué) est additionné au milieu (étape 3, figure 18). Ce deuxième anticorps va se fixer sur le deuxième épitope de l'antigène et va prendre « en sandwich » l'antigène entre les deux anticorps. Ensuite, un simple lavage permet d'éliminer l'excès d'anticorps marque non lié.

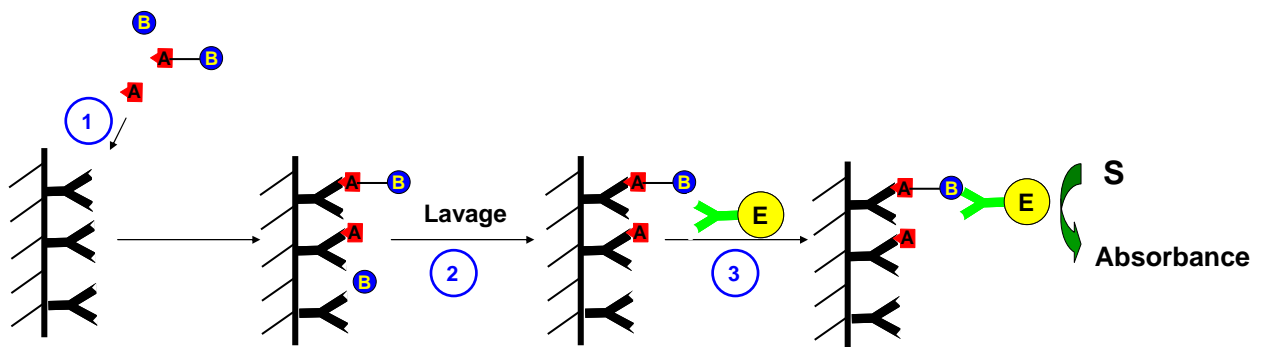


Figure 18. Méthode immunométrique à deux sites (sandwich). Anticorps noir = anticorps de capture, anticorps vert = anticorps de détection, A-B = antigène, E = AChE

Contrairement au test précédent, la concentration en antigène est dans ce cas directement proportionnelle à la valeur de l'absorbance (densité optique, DO) suite à l'activité enzymatique (AChE).

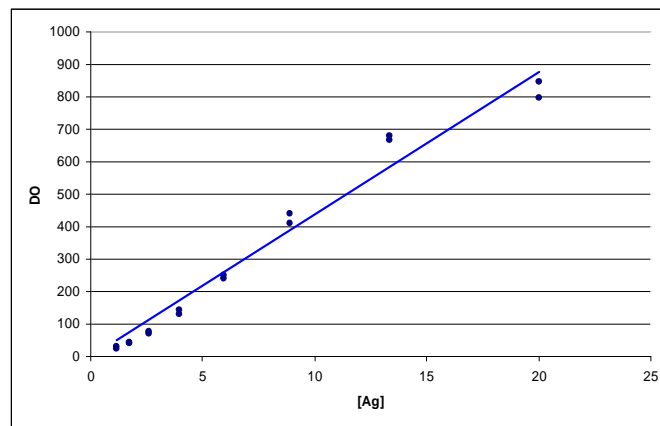


Figure 19. Courbe d'étalonnage typique pour un dosage « sandwich »

Les tests immunologiques ont des applications très nombreuses en biologie et en particulier dans le domaine du diagnostic, par contre, jusqu'à présent, leurs applications pour répondre à des questions de chimie restent très limitées.

Chapitre 2. Criblage de réactions énantiosélectives à l'aide d'anticorps monoclonaux énantiospécifiques

Empruntés à l'industrie pharmaceutique, les concepts de la chimie combinatoire et du criblage à haut débit ont été intégrés et utilisés avec succès dans le domaine de la catalyse organométallique depuis une dizaine d'années comme nous l'avons résumé dans le chapitre introductif. Il existe en effet un nombre important de paramètres qui peuvent influencer sur une réaction chimique catalysée par un complexe organométallique (nature du métal, du ligand, solvant, température, stœchiométries etc.) et bien souvent il est très difficile de prédire leur impact respectif sur l'efficacité de la réaction. Ceci est particulièrement vrai lorsque l'assise théorique, mécanistique, de la réaction en question est mal établie dans la littérature. La combinaison catalyse et criblage à haut débit peut s'avérer dans ces circonstances extrêmement utile car elle permet d'accéder à un grand nombre d'informations en peu de temps. Cette approche nécessite toutefois un appareillage approprié permettant d'effectuer un grand nombre de catalyses en mode parallèle et une méthode de criblage permettant de sélectionner rapidement la ou les meilleures conditions réactionnelles. Cette dernière exigence est encore aujourd'hui l'un des points limitants de cette approche. Malgré les efforts de nombreuses équipes de recherche à travers le monde, que nous avons tenté de résumer dans l'introduction de ce manuscrit, le nombre de méthodes de criblage fiables et rapides reste limité.⁵⁴

Suite à une collaboration entretenue avec le Service de Pharmacologie et d'Immunologie (SPI), il nous est apparu évident que les méthodes de l'immunoanalyse répondent parfaitement au cahier des charges d'une bonne méthode de criblage. Ces méthodes sont en effet couramment utilisées par l'industrie du diagnostic où la cadence et la précision de la mesure sont des qualités de la plus haute importance.

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre 1, les méthodes immunoanalytiques reposent sur la reconnaissance anticorps/antigène ou anticorps/haptène et permettent une détection d'un composé dans des milieux complexes sans obligation de traitement ou purification des échantillons.

Notre objectif est donc d'adapter ce type de test au criblage de catalyseurs et notamment de catalyseurs asymétriques (figure 20).

⁵⁴ a) A. Hagemeyer, P. Strasser, A.F. Volpe, *High-Throughput Screening in Chemical Catalysis*, Wiley-VCH; b) M.T. Reetz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1335.

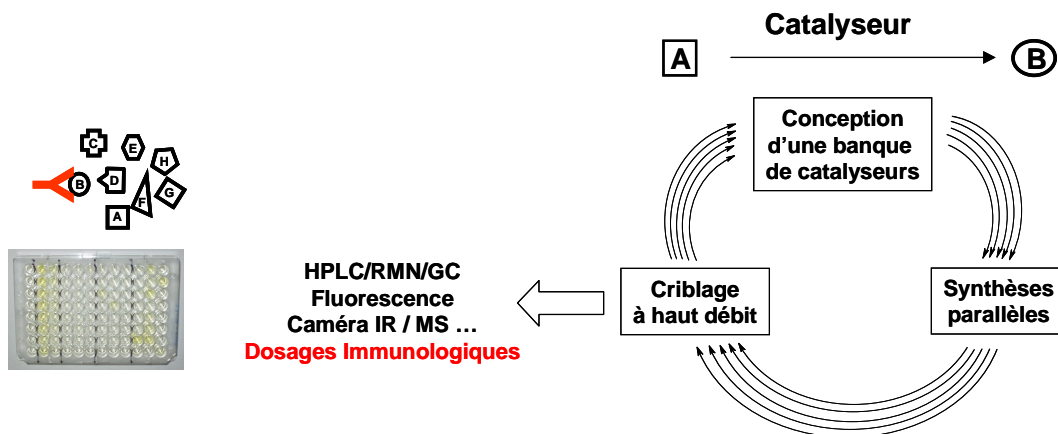


Figure 20. Dosages immunologiques comme outil pour la recherche de nouveaux catalyseurs.

Le criblage de réactions asymétriques par immunoanalyse nécessite de disposer d'anticorps capables de lier et donc de doser un seul des deux énantiomères du produit de la réaction pour laquelle nous souhaitons découvrir un ou plusieurs catalyseurs.

De tels anticorps énantiospécifiques sont des outils précieux et peu d'articles dans la littérature traitent de leur obtention et caractérisation. Après un bref rappel bibliographique de l'état des connaissances sur les anticorps ayant des vertus d'énantio-sélection de liaison et des résultats du laboratoire obtenus avant le début de ce travail de thèse, nous présenterons les travaux effectués durant cette thèse dont l'objectif est d'optimiser et d'utiliser ce type de test de criblage vis-à-vis de deux réactions chimiques ciblées.

I. Art antérieur et résultats du laboratoire

I.1. Rappel de la littérature sur les anticorps énantiospécifiques.

Les anticorps sont des protéines, il peut donc sembler évident qu'ils soient capables, comme des récepteurs ou des enzymes, de lier de façon énantiosélective un composé chiral donné. Dès 1928, Karl Landsteiner, qui avait déjà établi les bases de la reconnaissance moléculaire par le système immunitaire, a pu démontrer que les anticorps étaient capables de discriminer les stéréoisomères de composés chiraux.⁵⁵ De façon très surprenante cette découverte n'a pas été valorisée durant de nombreuses années.

Ce n'est qu'en 1998 que l'équipe de B. S. Green publie un article fondateur dans lequel la faisabilité de produire des anticorps énantiospécifiques est démontrée.⁵⁶ Ces chercheurs ont utilisé deux haptènes énantiopurs dérivés de la phénylalanine possédant une fonction azido permettant leur accrochage covalent à une protéine porteuse (schéma 15). Les bio-conjugués ainsi obtenus ont servi à l'immunisation d'animaux qui ont alors produits des anticorps contre ces haptènes.

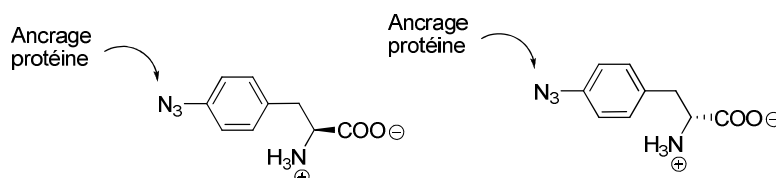


Schéma 15. Structure des haptènes ayant conduit à l'obtention d'anticorps énantiospécifiques.

Les anticorps récoltés se sont avérés fortement énantiodiscriminants : seul un énantiomère de la phénylalanine est reconnu par ces anticorps (celui ayant servi à l'immunisation). Ainsi, des anticorps anti-(L) et anti-(D)-acides aminés ont été obtenus et utilisés plus tard dans une série d'applications telles que le développement d'immunosensors énantiodiscriminants⁵⁷ pour la détection de traces d'impuretés énantiomériques.⁵⁸

⁵⁵ K. Landsteiner, J. van der Scheer, *J. Exp. Med.* **1928**, 48, 315.

⁵⁶ O. Hofstetter, H. Hofstetter, V. Schurig, M. Wilchek, B.S. Green, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 3251.

⁵⁷ a) O. Hofstetter, H. Hofstetter, M. Wilchek, V. Schurig, B.S Green, *Nat. Biotech.* **1999**, 17, 371; b) P. Dutta, C.A. Tipple, N.V. Lavrik, P.G. Datskos, H. Hofstetter, O. Hofstetter, M.J. Sepaniak, *Anal. Chem.* **2003**, 75, 2342.

Ce travail a également permis de démontrer qu'il était possible de produire des anticorps contre des constituants du « soi ». En effet, les acides aminés (L) sont largement présents in vivo puisqu'ils constituent les briques élémentaires des protéines, or l'un des dogmes de l'immunologie stipule que l'on ne peut induire de réponse immunitaire contre des éléments appartenant aux molécules endogènes.

Un autre travail mené initialement par une équipe finlandaise puis relayé par l'équipe de C. R. Martin en Floride décrit l'obtention d'anticorps énantiospécifiques et leur utilisation à des fins de séparation d'énantiomères. Le composé triazole, dont la structure est décrite dans le schéma 16, présente une activité inhibitrice d'enzymes de type aromatasase. Ce composé comprend deux centres stéréogènes et sa synthèse ne permet pas de les contrôler. Les auteurs ont alors entrepris de produire des anticorps énantiospécifiques dans le but de développer une méthode séparative efficace.

L'haptène choisi pour ce travail comprend une fonction acide carboxylique permettant son ancrage sur la protéine porteuse et a été utilisé sous forme racémique. On peut donc considérer que 4 composés différents ont été présentés au système immunitaire (immunogène RR, RS, SR et SS). Après les étapes d'immunisation et clonage, 4 anticorps monoclonaux ont finalement été isolés et produits. Deux de ces anticorps n'ont pas de réelle énantiospécificité de liaison pour le composé biologiquement actif, les deux autres possèdent par contre une préférence de liaison prononcée pour un seul énantiomère.⁵⁹

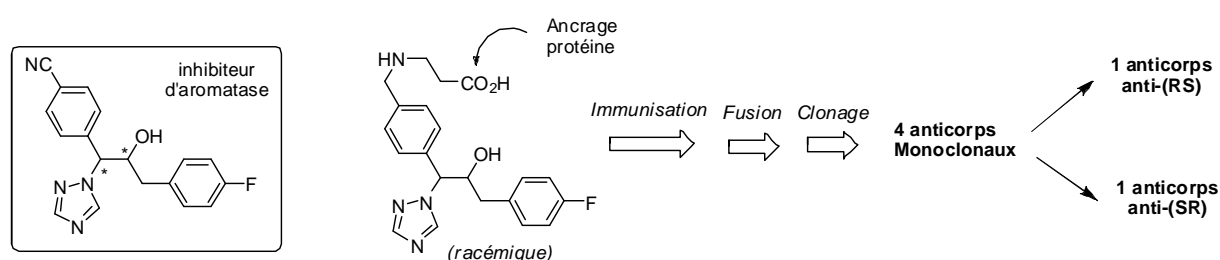


Schéma 16. Structures du composé biologiquement actif et de l'haptène ayant servi à obtenir des anticorps monoclonaux énantiospécifiques.

Ces anticorps ont été par la suite fixés sur un support solide et ont permis l'isolation des énantiomères du composé inhibiteur.⁶⁰

⁵⁸ a) O. Hofstetter, H. Hofstetter, M. Wilchek, V. Schurig, B.S. Green, *Chem. Commun.* **2000**, 1581; b) O. Hofstetter, H. Hofstetter, *Enantiomer* **2000**, 6, 153 c) A. Tsourkas, O. Hofstetter, H. Hofstetter, R. Weissleder, L. Josephson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 2395.

⁵⁹ T.K. Nevanen, L. Söderholm, K. Kukkonen, T. Suortti, T. Teerinen, M. Linder, H. Söderlund, T.T. Teeri, *J. Chromatogr. A* **2001**, 925, 89.

⁶⁰ S.B. Lee, D.T. Mitchell, L. Trofin, T.K. Nevanen, H. Söderlund, C.R. Martin, *Science* **2002**, 296, 2198.

A notre connaissance, outre les résultats obtenus dans notre laboratoire, les travaux publiés par l'équipe de B. S. Green et celle de C. R. Martin sont les seuls décrits dans la littérature concernant la production et l'utilisation d'anticorps énantiospécifiques.

Aucune des applications décrites ne fait appel à l'utilisation d'anticorps énantio-discriminants dans un but de cribler des réactions ou de catalyseurs.

I.2. Résultats du laboratoire

Dès 1997, notre laboratoire s'est intéressé à la production d'anticorps anti- α -hydroxy-acides. Les premiers travaux avaient pour objectif d'étudier la réponse immunitaire en fonction du mode d'ancrage de l'haptène α -hydroxy-acide.⁶¹ En effet, il est communément admis que le mode d'ancrage de l'haptène à la protéine porteuse oriente la réponse anticorps vers les motifs structuraux les plus éloignés du point d'ancrage.⁶² En d'autres termes, la spécificité des anticorps est maximale pour la partie de l'haptène la plus éloignée du point d'ancrage à la protéine porteuse. Ainsi, deux haptènes dérivés de l'acide mandélique ont été couplés à une protéine porteuse via deux points d'ancrage bien distincts (schéma 17). Chaque haptène a été utilisé sous forme racémique puis les immunogènes ont été injectés à des lapins.

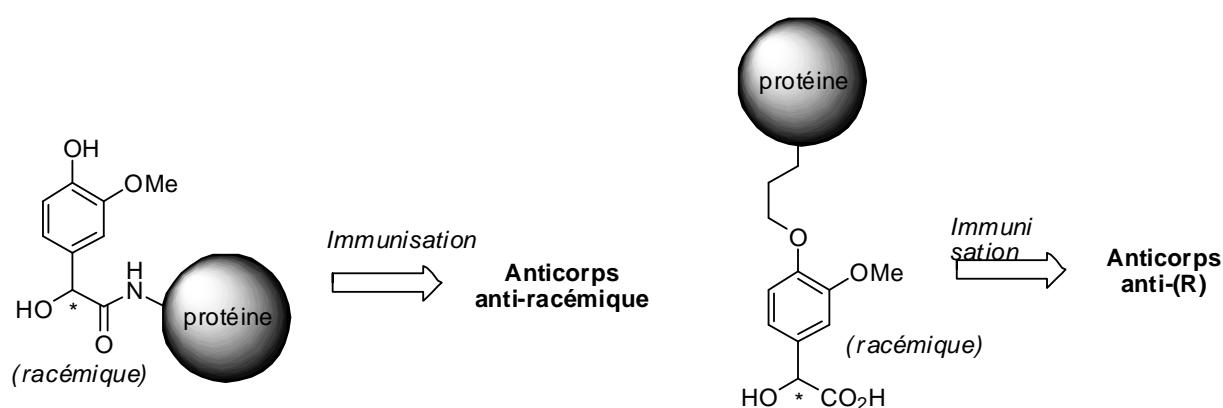


Schéma 17. Influence du mode d'ancrage de l'haptène sur la réponse anticorps.

Les résultats de ces immunisations ont montré que, comme attendu, les anticorps polyclonaux les plus spécifiques pour le motif α -hydroxy-acide sont ceux résultants d'une

⁶¹ F. Taran, H. Bernard, A. Valleix, C. Créminon, J. Grassi, D. Olichon, J.-R. Deverre, P. Pradelles, *Clin. Chim. Acta* **1997**, 264, 177.

⁶² M. Sela, *Science* **1969**, 166, 1365.

immunisation par un immunogène présentant la fonction α -hydroxy-acide la plus éloignée du point d'ancrage à la protéine. Cette spécificité s'est avérée être de surcroît une énantiospécificité puisque les anticorps polyclonaux obtenus se sont avérés lier de façon privilégiée l'énantiomère (*R*) du dérivé de l'acide mandélique. Ces anticorps ont par la suite été utilisés comme outil analytique permettant le suivi de réactions chimiques.⁶³

Des travaux ultérieurs du laboratoire ont amené à produire des anticorps monoclonaux dirigés contre un autre analogue de l'acide mandélique (haptène **H3**, schéma 18).⁶⁴ Ce composé, une fois couplé à une protéine porteuse, a été injecté aux animaux sous forme racémique. Suite à des étapes de culture cellulaire et de clonage, 13 anticorps monoclonaux (AcMs) ont pu être obtenus et produits en grandes quantités (schéma 18). Des expériences de tests de compétition de liaison menées avec les deux énantiomères de l'acide mandélique ont alors montré que l'on disposait de deux populations d'anticorps : des anti-racémiques (8 AcMs) mais aussi des anticorps énantiospécifiques c'est-à-dire ne liant qu'un seul énantiomère de l'acide mandélique (4 AcMs anti-(*S*) et 1 AcM anti-(*R*)). Malheureusement l'AcM anti-(*R*), bien que très énantiodiscriminant, ne possède pas d'affinité suffisamment forte pour l'acide mandélique pour être utilisé lors de test de criblage.

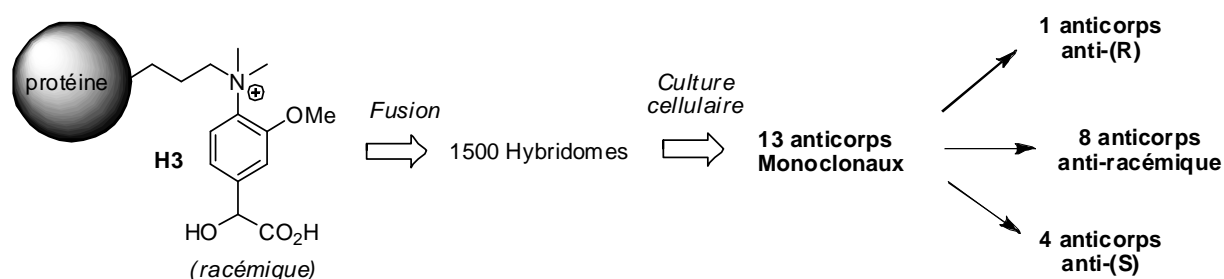


Schéma 18. Structures de l'haptène **H3** ayant servi à obtenir des anticorps monoclonaux anti- α -hydroxy-acides énantiospécifiques.

Dès lors il était facile d'imaginer l'utilisation de ces anticorps pour le suivi de réactions asymétriques : un anticorps anti-racémate (AcM 15) servira à la mesure du rendement chimique d'une réaction générant l'acide mandélique et un anticorps énantiospécifique (anti-(*S*), AcM 8) à la mesure de la concentration d'un seul énantiomère et donc au calcul de l'excès énantiomérique *via* des tests de compétition de liaisons.

⁶³ a) F. Taran, P.-Y. Renard, C. Créminon, A. Valleix, Y. Frobert, P. Pradelles, J. Grassi, C. Mioskowski, *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 1887. b) F. Taran, P.-Y. Renard, C. Créminon, A. Valleix, Y. Frobert, P. Pradelles, J. Grassi, C. Mioskowski, *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 1891.

⁶⁴ F. Taran, P.-Y. Renard, H. Bernard, C. Mioskowski, Y. Frobert, P. Pradelles, J. Grassi, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 3332.

Pour valider ce concept, des travaux ont été entrepris sur la réaction de réduction énantiosélective de l'acide benzoyl-formique (BF) en acide mandélique (MA) par transfert d'hydrogène sous catalyse organométallique (figure 21).

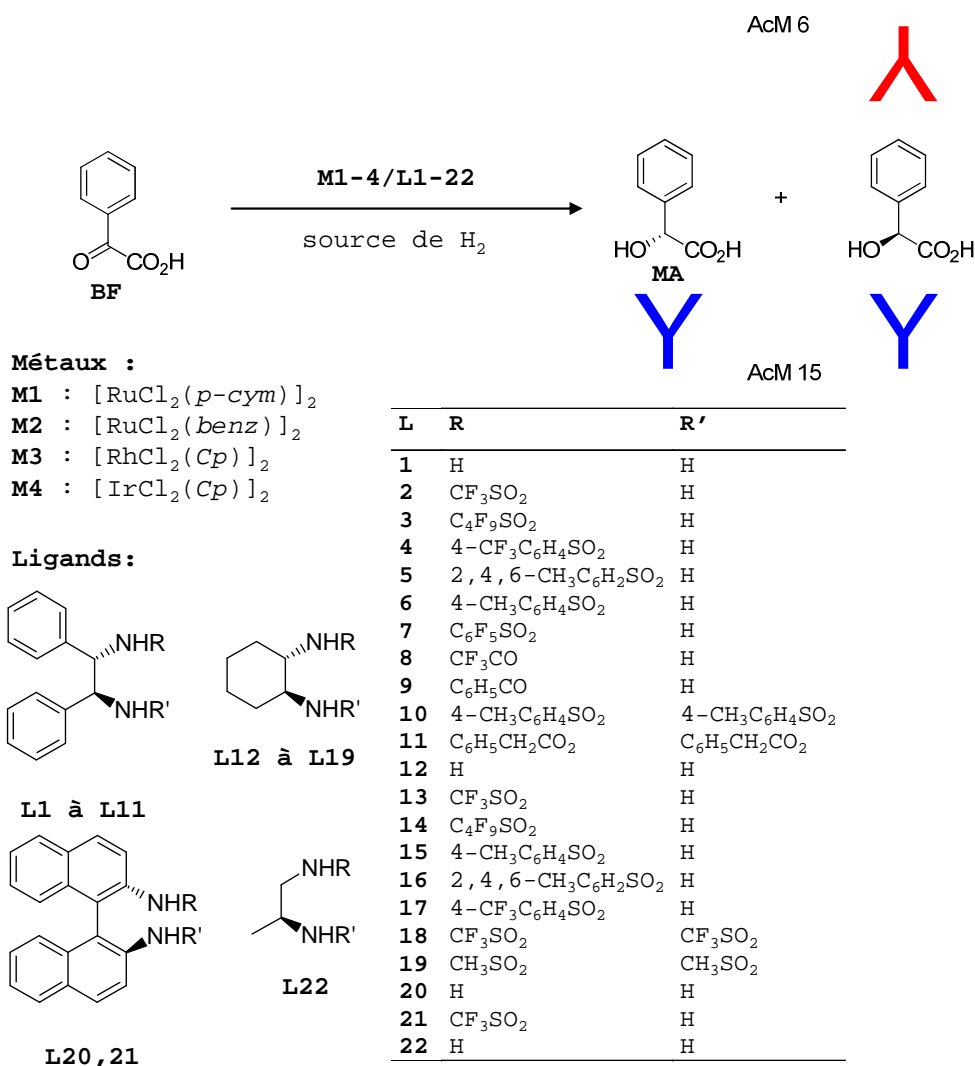


Figure 21. Réaction cible et systèmes catalytiques choisis. BF = acide benzoyl-formique ; MA = acide mandélique.

22 ligands chiraux et 4 métaux différents ont ainsi été combinés dans différentes conditions de solvants en présence de 2 sources d'hydrogène. Plusieurs centaines d'expériences ont été ainsi réalisées en mode parallèle dans des plaques de microtitration (96 puits) puis criblées à l'aide des anticorps (figure 22).

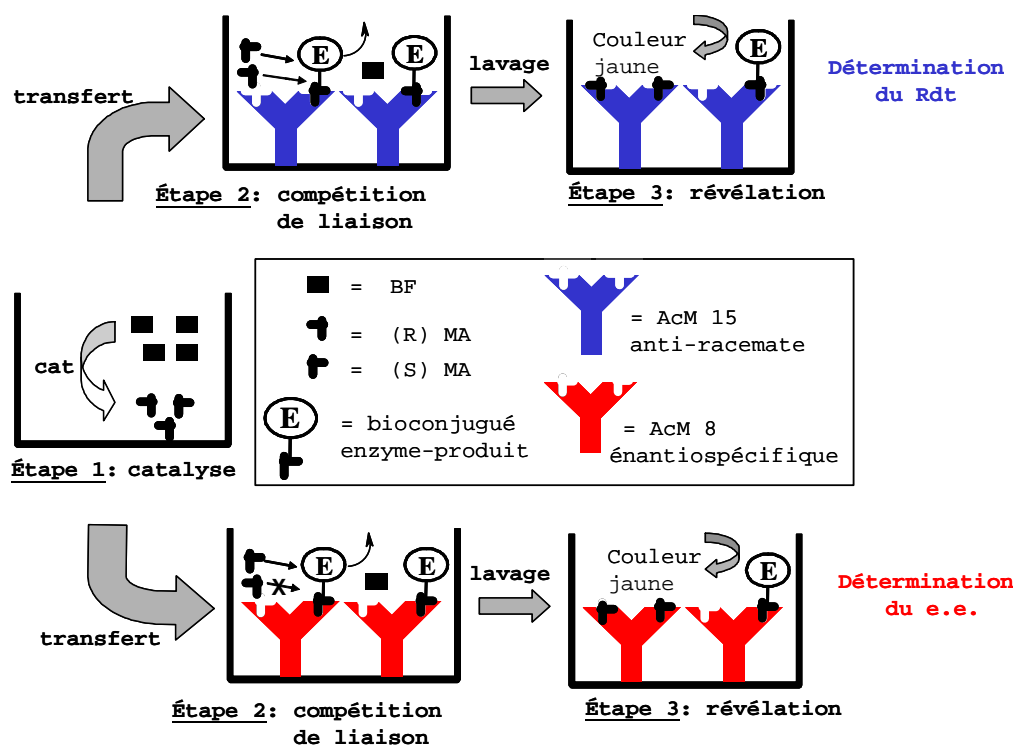


Figure 22. Procédure de criblage des catalyses. BF = acide benzoyl-formique ; MA = acide mandélique ; E = Acétylcholinestérase.

La procédure s'opère en trois étapes : une fois les réactions catalytiques réalisées dans des plaques de 96 puits (étape 1), les bruts réactionnels sont alors transférés sans traitement dans les puits de deux autres plaques (une pour la mesure du rendement chimique, l'autre pour celle de l'excès énantiomérique, étape 2) contenant les ingrédients nécessaires aux tests immunoanalytiques. Il s'établit alors une compétition de liaison vis-à-vis des sites des anticorps adsorbés sur le support solide. Après une étape de lavage, l'activité enzymatique du conjugué **H3**-Acétylcholine-estérase est révélée par addition du réactif d'Ellman (étape 3). L'intensité de la couleur jaune observée en fin de processus est inversement proportionnelle à la concentration en produit de réaction (acide mandélique, MA). Catalyses et criblage de l'ensemble des différentes combinaisons ont été réalisés en seulement 3 jours.⁶⁵ La figure 23 montre une partie des résultats, parmi les plus significatifs.

⁶⁵ F. Taran, C. Gauchet, B. Mohar, S. Meunier, A. Valleix, P.-Y. Renard, C. Créminon, J. Grassi, A. Wagner, C. Mioskowski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 124.

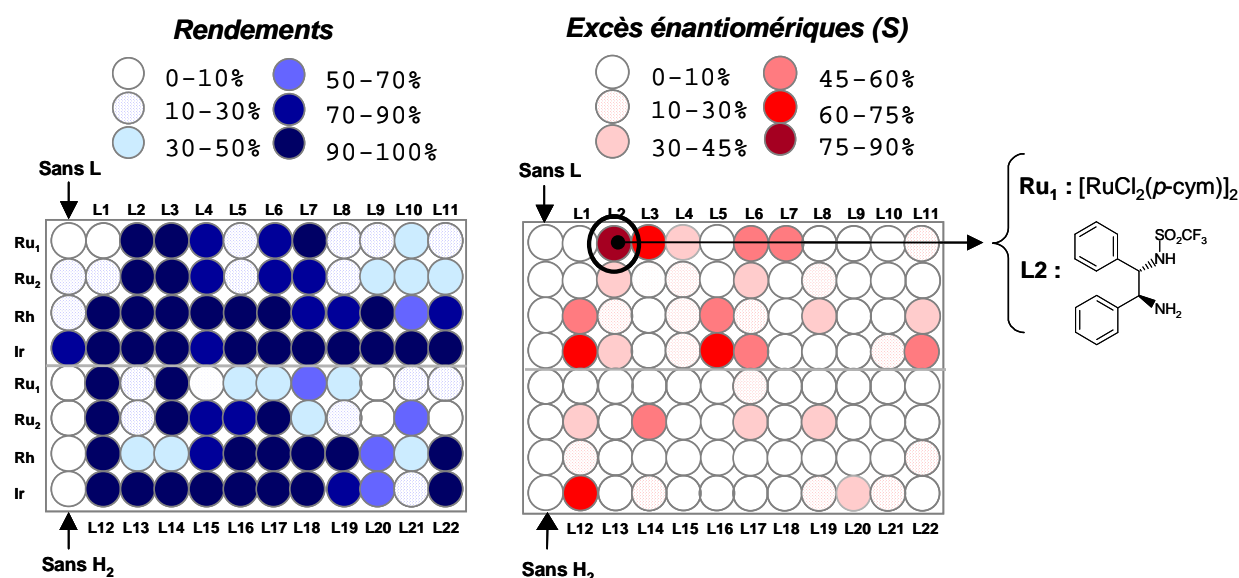


Figure 23. Résultats du criblage de 96 catalyses réalisées dans un mélange DMF/H₂O à 25°C en présence de 2% de catalyseur (rapport M :L = 1 :1,6) et de HCOOH/TEA. Chaque puits correspond à une combinaison particulière de métal et de ligand L.

Sur l'ensemble des expériences réalisées, une seule combinaison s'est avérée efficace en termes à la fois de rendement et d'excès énantiomérique. Deux types de contrôles ont alors été réalisés: il a tout d'abord été vérifié que le système catalytique mis au jour par la méthode de criblage était réellement efficace dans les conditions de synthèse organique classique (schéma 19).

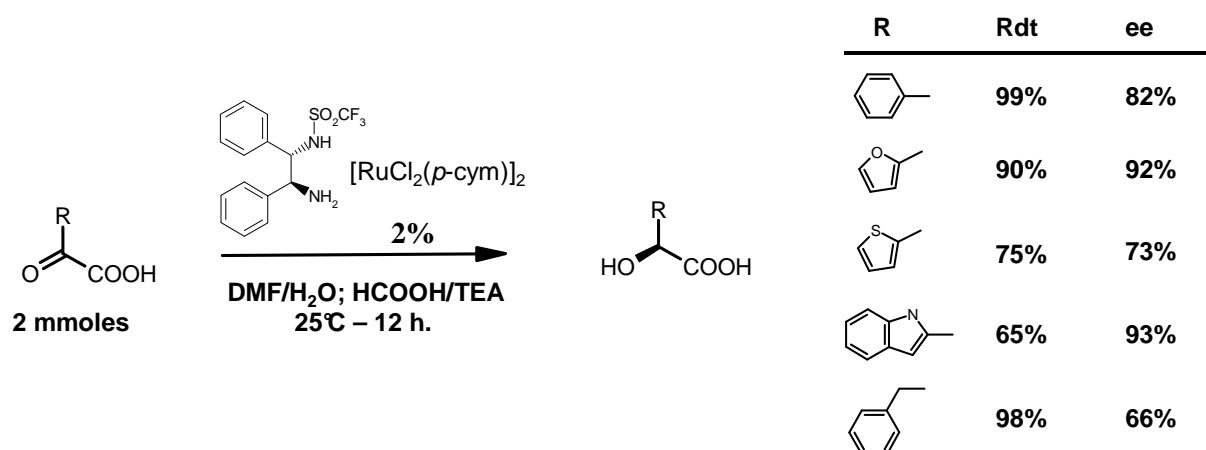


Schéma 19. Réduction énantiosélective d' α -cétoacides par le système catalytique mis en évidence lors du criblage. Valeurs déterminées par CLHP.

Puis 42 échantillons pris au hasard ont été analysés par CLHP, les rendements et les excès énantiomériques ont alors été confrontés aux résultats obtenus par la méthode immunoanalytique, d'excellentes corrélations ont été obtenues (figure 24).

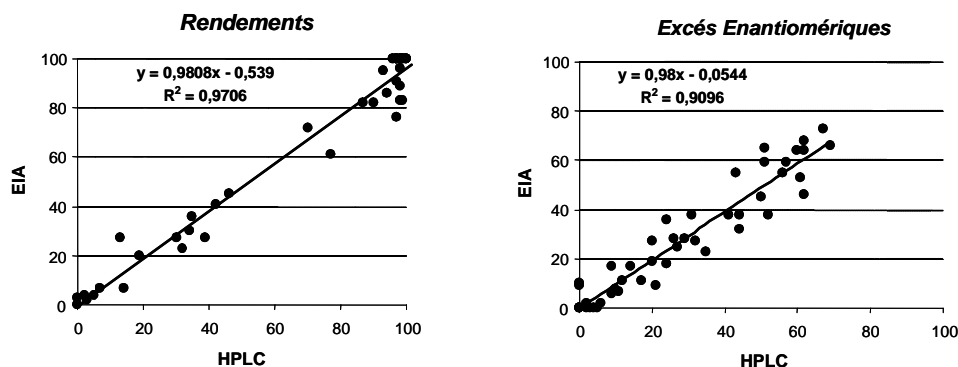


Figure 24. Corrélations entre les valeurs de rendements et d'excès énantiomériques obtenus par CLHP et test immunologiques (EIA).

Ces résultats montrent bien que la technique immunoanalytique est fiable et permet de cribler un grand nombre de réactions en un temps très court. En revanche, il faut admettre une certaine imprécision de la mesure : l'analyse statistique des résultats montre que l'intervalle de confiance dans la détermination des rendements et des excès énantiomérique est de $\pm 10\%$.

Une autre limitation de ce test est sa sensibilité. En effet, l'anticorps anti-racémique utilisé (AcM 15) ne possède qu'une affinité médiocre pour l'acide mandélique. En conséquence, les bruts réactionnels ont dû être testés relativement concentrés ce qui pose deux problèmes : *i)* les réactions catalytiques ont dû être réalisées en milieu très concentré (0,1M) ce qui est consommateur à la fois en réactifs et en catalyseur et *ii)* certaines interférences ont parfois été constatées au cours du criblage résultant d'incompatibilité entre certains catalyseurs organométalliques et le traceur enzymatique utilisé lors du test.

Au cours de ce travail de thèse nous avons été amenés à utiliser des systèmes catalytiques dont nous ne disposions qu'en très faible quantité. Nous avons donc eu comme premier objectif d'optimiser ce test de criblage et en particulier d'en améliorer sa sensibilité.

II. Optimisation de la technique de criblage

Dans cette partie du projet de thèse deux réactions ont particulièrement focalisé notre attention : la réduction énantiosélective d' α -céto-esters et l'insertion énantiosélective d'espèces métal-carbénoides dans la liaison OH de l'eau (schéma 20). Ces réactions génèrent des α -hydroxy-esters qui après une étape (non racémisante)⁶⁶ de saponification conduisent aux α -hydroxy-acides pouvant être détectés par des anticorps monoclonaux anti-**H3**.

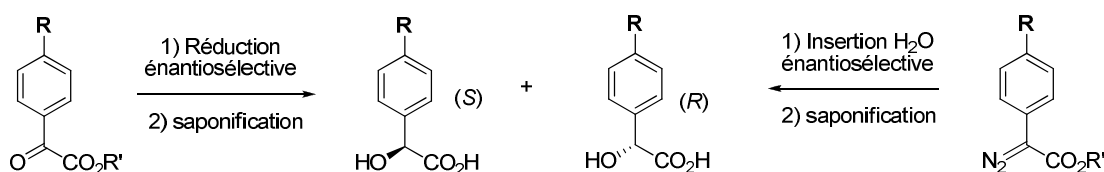


Schéma 20. Réactions cibles

La façon la plus évidente d'améliorer les performances en terme de sensibilité du test de criblage est d'ajuster les structures des substrats (au niveau du groupement R, schéma 21) de ces réactions de manière à ce que les produits générés soient mieux reconnus par les anticorps que ne l'était l'acide mandélique. Ces anticorps ont été produits suite à une immunisation par l'haptène **H3** qui comprend le motif acide mandélique mais aussi un ammonium quaternaire et un groupement méthoxy (schéma 21).

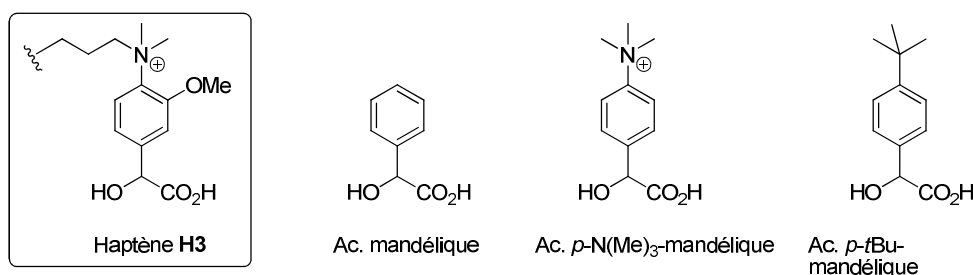


Schéma 21. Structure de l'haptène **H3** et de deux dérivés d'acides mandéliques.

Nous avons donc opté pour la synthèse de deux dérivés de l'acide mandélique (MA) comportant une substitution en position *para* qui se rapproche structuellement de celle de l'haptène **H3**. Le premier de ces dérivés comporte donc un groupement ammonium quaternaire

⁶⁶ Y. Sun, X. Wang, J. Wang, Q. Meng, H. Zhang, L. Jiang, Z. Zhang, *Org. Lett.* **2005**, 7, 5425.

qui a l'avantage de reproduire celui présent dans la structure du composé **H3** mais qui peut poser des problèmes de solubilité et/ou de réactivité des substrats correspondant. Le deuxième dérivé comprend un groupement *tert*-butyl qui peut interagir avec les sites de liaison des anticorps par des liaisons hydrophobes et ainsi permettre une meilleure liaison ; ce groupement a l'avantage d'être plus inerte chimiquement que ne l'est un groupement ammonium.

Afin de voir si les anticorps complexent de façon forte et énantiosélective ces deux composés, il est nécessaire de disposer des deux énantiomères purs de chacun de ces α -hydroxy-acides. Nous avons opté pour une synthèse des composés racémiques suivie d'une séparation par CLHP sur colonne chirale. Les tests immunologiques ne demandent que de très faibles quantités de produit ($\sim\mu\text{g}$) pour être réalisés, aussi les séparations des énantiomères de chaque dérivés ont été réalisées suite à des injections sur colonne analytique.

La synthèse du produit portant une substitution en *para* triméthylammonium a été faite en quatre étapes, avec un rendement global de 43%. En faisant réagir le *para*-(diméthylamino)benzaldéhyde avec le cyanure de triméthylsilyyle en présence de TEA la cyanhydrine correspondante est obtenue avec un rendement quantitatif. Ce produit est ensuite hydrolysé en présence de MeOH/HCl pour fournir l' α -hydroxyester correspondant avec un rendement de 43%. La réaction de ce dernier produit avec l'iodure de méthyle dans l'acétone à reflux permet d'accéder au composé *N*-triméthylammonium, qui, après saponification fournit l' α -hydroxyacide attendu avec un rendement quantitatif.

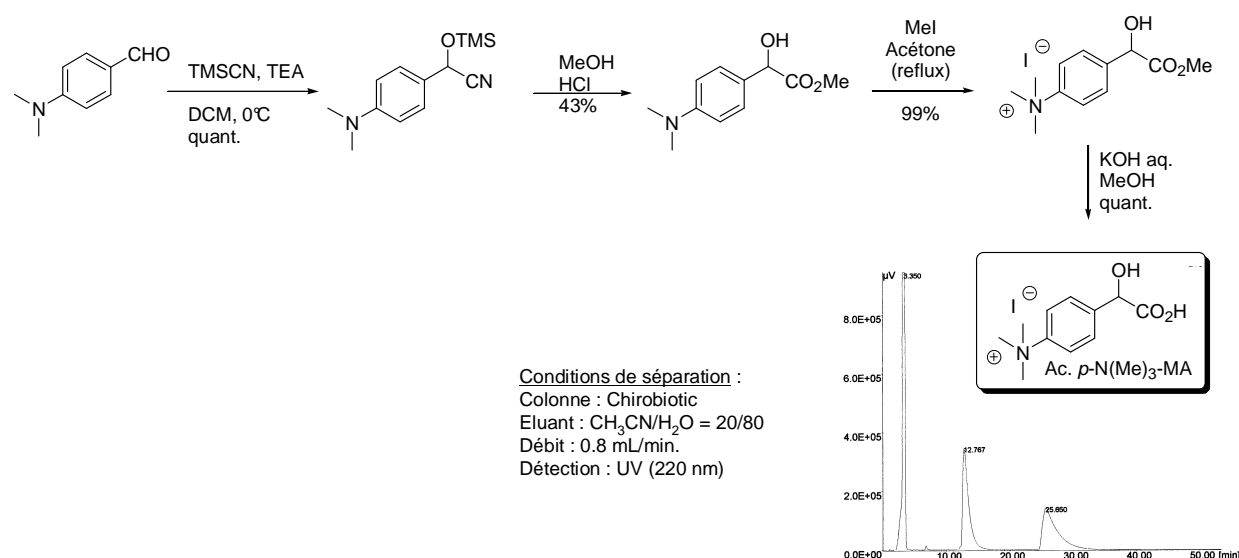


Schéma 22. Synthèse de l'acide *p*-N(Me)₃-MA.

En ce qui concerne l'autre produit, portant une substitution *tert*-butyle en *para*, deux voies de synthèse ont été utilisées, une voie de synthèse qui ressemble à celle présentée précédemment, et qui conduit au produit α -hydroxyacide en trois étapes avec un rendement global de 50% et une autre voie⁶⁷, plus directe, qui permet par condensation de l'aldéhyde de départ sur le bromoforme d'accéder au produit envisagé en une seule étape et avec un rendement de 95%.

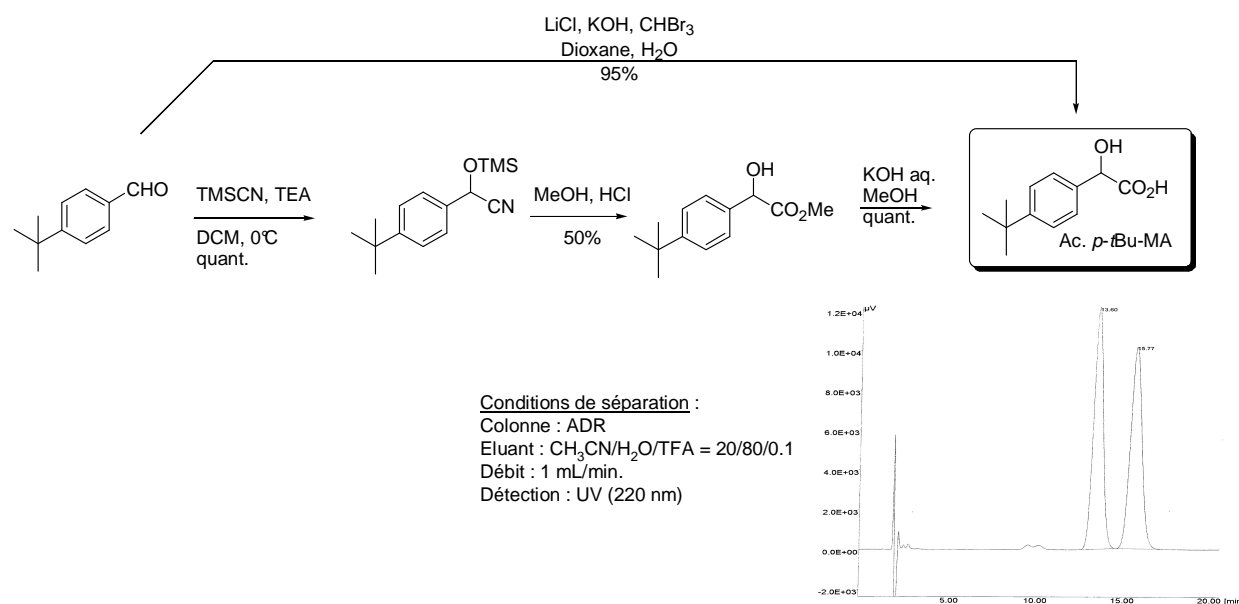
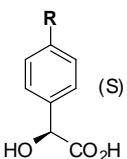


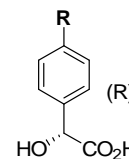
Schéma 23. Synthèse de l'acide *p*-*t*Bu-MA.

Maintenant que nous disposons des deux énantiomères de ces composés α -hydroxy-acides nous avons estimé la capacité des anticorps à les lier de façon énantiospécifique. De façon parallèle l'acide mandélique a également été utilisé comme composé de référence. Nous avons gardé l'anticorps AcM 8 comme anticorps spécifique de l'isomère (*S*) des α -hydroxy-acides puisque, comme mentionné dans le paragraphe précédent, celui-ci possède de bonnes propriétés de liaison. En revanche, nous avons décidé d'étudier les propriétés de liaison de l'AcM 6, qui est le seul anticorps monoclonal anti-(*R*), dans le but de remplacer l'anticorps anti-racémique AcM 15. Les résultats sont résumés dans le tableau 1.

⁶⁷ N. Momiyama, H. Yamamoto, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 1080.



(S)



(R)





AcM	R	B/Bo 50% (μ M)	B/Bo 50% (μ M)	Réaction croisée
AcM 6 (anti-(R))	H	n.d.	8000	0%
		n.d.	11,5	0%
		0,94	0,03	3,2%
AcM 8 (anti-(S))	H	20	n.d.	0%
		0,78	n.d.	0%
		0,42	10,24	4,1%

Tableau 1. Enantiospécificité des deux AcMs pour 3 α -hydroxy-acides.

Les résultats montrent globalement que les deux anticorps testés ont de bien meilleures affinités pour ces deux nouveaux α -hydroxy-acides que pour l'acide mandélique et conservent leur forte énantiospécificité de liaison. L'AcM 6 qui ne pouvait pas être utilisé dans un criblage de réaction générant l'acide mandélique possèdent des capacités de liaison suffisantes pour les composés *p*-N(Me)₃-MA et *p*-*t*Bu-MA pour être désormais employé dans des tests de criblage. Cet anticorps pourra donc remplacer avantageusement l'anticorps anti-racémique AcM 15.

Nous avons choisi le composé *p*-*t*Bu-MA comme produit à détecter dans les réactions chimiques que nous envisageons. En effet, ce composé est très soluble dans les solvants organiques et la présence d'un groupement *t*Bu n'est pas susceptible de gêner au bon déroulement des réactions, ce qui n'est pas forcément le cas du composé *p*-N(Me)₃-MA.

La figure 25 montre les gammes étalons obtenues avec les deux anticorps spécifiques et les deux énantiomères du *p*-*t*Bu-MA. Ces résultats attestent de l'excellente énantiospécificité des anticorps vis-à-vis de ce composé.

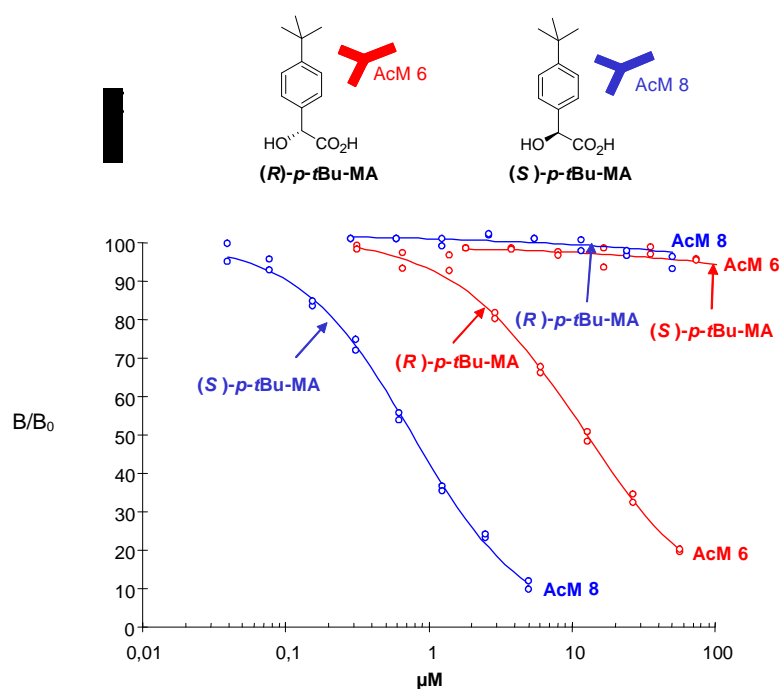


Figure 25. Gammes étalon obtenues avec les deux anticorps énantiosélectifs pour les deux énantiomères du *p*-*t*Bu-MA. Conditions : dans les puits d'une plaque 96 puits sont additionnés 50 μ L d'ACM (AcM6 ou AcM8) à 10ng/mL, 50 μ L de traceur enzymatique **H3**-AChE à 2 Uell et 50 μ L de *p*-*t*Bu-MA (*R*) ou (*S*) à différentes concentrations. Incubation 12 h à 4°C, lavages puis révélation de l'activité enzymatique par addition de 300 μ L du réactif d'Ellman.

L' α -hydroxy-acide *p*-*t*Bu-MA est détecté par les deux anticorps avec des sensibilités environ 100 fois plus élevées que l'acide mandélique, le test de criblage sera donc environ 100 fois plus sensible. Les réactions chimiques pourront être réalisées dans une gamme de concentrations pouvant aller de 1M à 1mM, ce qui est une nette amélioration par rapport au test initial.

Le test de criblage utilisera donc désormais deux anticorps énantiosécifiques, un anticorps qui détectera l'énantiomère (*R*) du composé *p*-*t*Bu-MA et un second qui détectera l'énantiomère (*S*). Les substrats que nous utiliserons lors des expériences de catalyse comprendront un groupement *t*Bu en *para* de la fonction qui sera le lieu de la catalyse.

Cependant avant de réaliser l'ensemble des expériences de catalyse et de criblage, il convient de vérifier la précision et la fiabilité de ce test optimisé.

Pour cela nous avons réalisé des dosages de mélanges des deux énantiomères du composé *p*-*t*Bu-MA à l'aide du test immunologique. Ainsi, les deux énantiomères ont été mélangés dans différentes proportions ((*R*)/(*S*) = 100/0; 90/10; 80/20; 70/30; 60/40; 50/50 ; 40/60 ; 30/70; 20/80; 10/90 et 0/100) de manière à préparer des solutions ayant des *ee* théoriques allant de 100% en faveur de l'énantiomère (*R*) à 100% en faveur de l'énantiomère (*S*). Les valeurs

expérimentales des *ee* des mélanges ont alors été déterminées par le test de criblage. Une excellente corrélation entre les valeurs théoriques et expérimentales a été trouvée (figure 26, A).

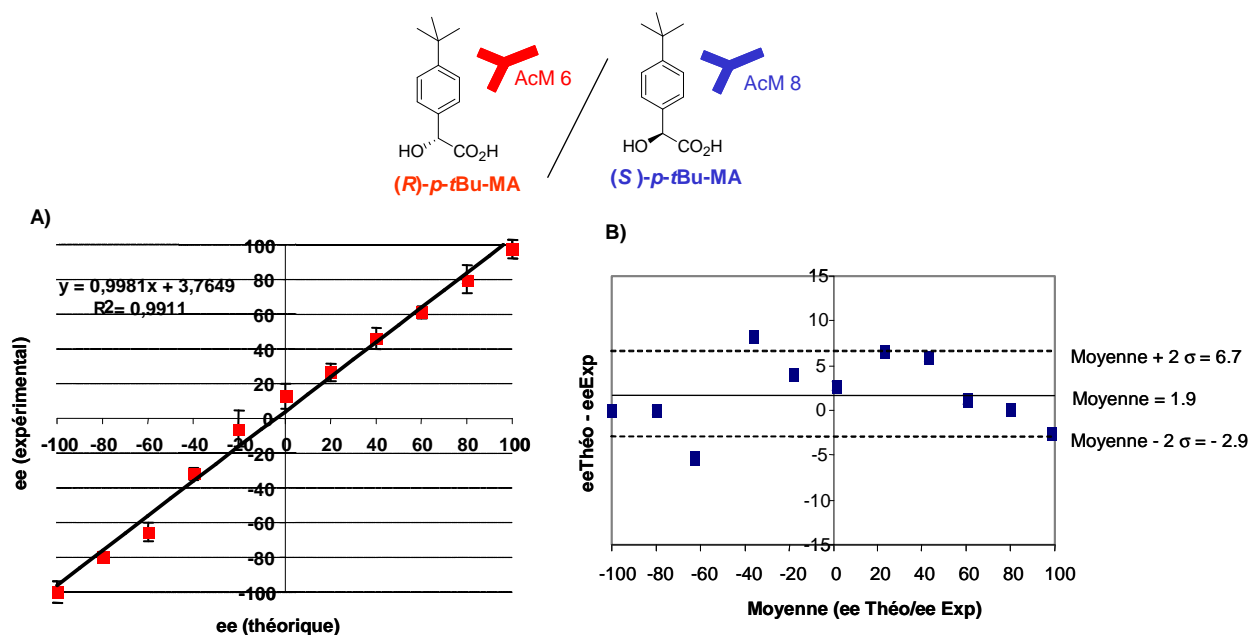


Figure 26. Validation du dosage. A) Corrélations des *ee* expérimentaux et théoriques ; B) représentation de Bland & Altman. Conditions : dans les puits d'une plaque 96 puits sont additionnés 50 μ L d'AcM (AcM 6 ou AcM 8) à 10 ng/mL, 50 μ L de traceur enzymatique H3-AChE à 2 Uell, 50 μ L de mélanges (R) + (S)-*p*-tBu-MA dont la concentration globale est de 10 μ M pour l'AcM 6 et 1 μ M pour l'AcM 8. Incubation 12 h à 4°C, lavages puis révélation de l'activité enzymatique par addition de 300 μ L du réactif d'Ellman.

L'ensemble des données de cette expérience peut être traité statistiquement, afin de déterminer la précision du dosage, par la représentation de Bland/Altman (figure 26, B))⁶⁸. Cette analyse représente la différence des valeurs théoriques et expérimentales en fonction de la moyenne des valeurs, elle donne un intervalle de confiance (correspondant à deux écarts types autour de la valeur médiane) pour la mesure de l'excès énantiomérique de $\pm 5\%$. De façon plus détaillé, cette représentation montre que la précision de ce test est meilleure lorsque les valeurs de *ee* sont fortes (écarts types plus proches de la médiane), elle est en revanche plus faible pour les *ee* modestes.

Ces résultats sont donc globalement encourageants puisqu'en choisissant judicieusement les composés à utiliser dans les réactions de catalyse, nous avons pu améliorer à la fois la sensibilité mais aussi la précision ($\pm 5\%$ contre $\pm 10\%$ avec l'acide mandélique) du test de criblage.

⁶⁸ J.M. Bland, D.G. Altman, *Lancet* **1986**, 1, 307.

III. Synthèse d' α -hydroxyacides chiraux

III.1. Importance des hydroxy acides

Les acides α -hydroxy carboxyliques chiraux et leurs esters représentent aujourd'hui des intermédiaires synthétiques importants⁶⁹. Ce type de motif fait partie de la structure de certaines molécules biologiquement actives, nous pouvons citer ici le Pobilukast (Smithkline ; antiasthmatique, antagoniste leucotriène), le Cefetecol (Glaxo ; antibiotique de la classe des céphalosporines de quatrième génération), l'Ambrisentan (Myogen ; traitement de la hypertension pulmonaire) et le Tezaglitazar (Astra Zeneca, traitement du diabète).

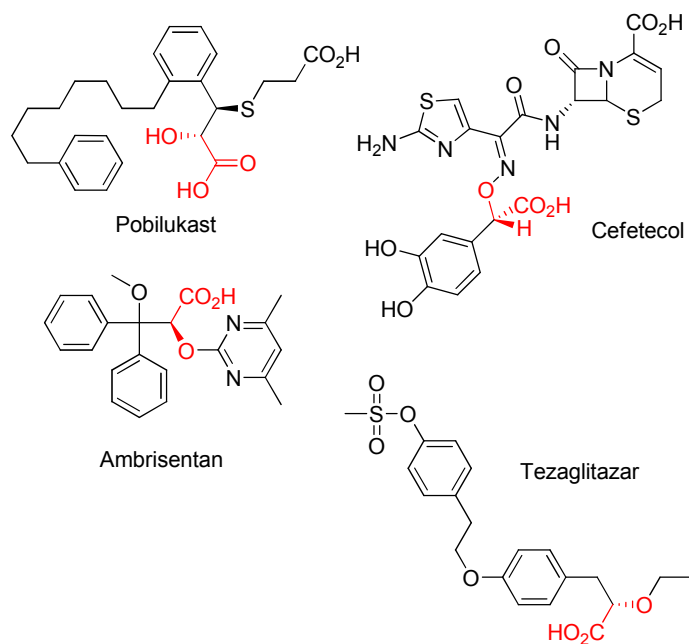


Schéma 24. Structure de quelques agents thérapeutiques ayant la structure d' α -hydroxy (ou alkoxy) acide

En tant qu'intermédiaire clé de synthèse, nous pouvons citer leur emploi pour la synthèse des produits biologiquement actifs tels que le Rupintrivir (Pfizer, antiviral), le Benazepril (Novartis, inhibiteur de l'enzyme de conversion) et le Cilazapril (Roche, inhibiteur de l'enzyme de conversion).

⁶⁹ a) S. Hanessian, *Total Synthesis of Natural Products : The Chiron Approach*, Pergamon, New York, **1983** ; b) K. Mori, *The Total Synthesis of Natural Products*, J. Apsimon, Ed., Wiley Interscience, New York, **1981**; c) D. Seebach, E. Hünigbühler, *Modern Synthetic Methods*, R. Scheffeld Ed., Otto Salle Verlag, Frankfurt am Main, **1980**.

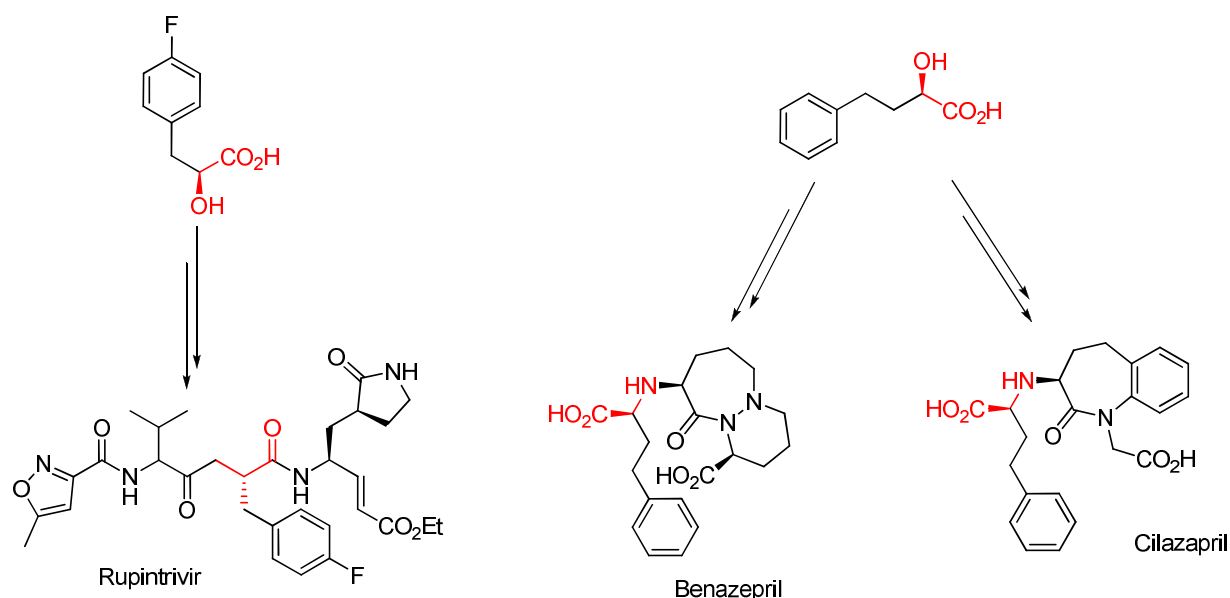


Schéma 25. Structure de deux α -hydroxyacides d'importance industrielle

III.2. Voies d'accès aux structures de type α -hydroxy acide

Plusieurs méthodes de préparation pour ce genre de composé ont été déjà publiées, parmi lesquelles nous pouvons citer des méthodes chimiques⁷⁰, méthodes utilisant la fermentation⁷¹, ou la catalyse enzymatique⁷².

Parmi les méthodes chimiques, seulement peu conduisent à des produits ayant des valeurs de *ee* importantes. Les méthodes de fermentation sont, en revanche, capables de fournir des produits ayant des valeurs de *ee* importantes par contre les concentrations obtenues en produit sont faibles et l'isolation de celui-ci difficile. Les méthodes enzymatiques représentent des

⁷⁰ a) K. Soai, T. Isoda, H. Hasegawa, *Chem. Lett.*, **1986**, 1897; b) J.K. Whitesell, R.M. Lawrence, H.H. Chen, *J. Org. Chem.*, **1986**, 51, 4779; c) J.K. Whitesell, D. Deyo, A. Bhattacharya, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, **1983**, 802; d) R. Gamboni, C. Tamm, *Tetrahedron Lett.*, **1986**, 27, 3999; e) T. Munegumi, M. Fujita, T. Marujama, S. Shiono, M. Takasaki, K. Harada, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1987**, 60, 249; f) H.C. Brown, B.T. Cho, W.S. Park, *J. Org. Chem.*, **1986**, 51, 3396; g) I. Ojima, *Pure Appl. Chem.*, **1984**, 54, 99; h) I. Ojima, T. Kogure, K. Achiwa, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, **1977**, 428; i) W.H. Pearson, M.C. Cheng, *J. Org. Chem.*, **1986**, 51, 3746; j) D.A. Evans, M.M. Morrissey, R.L. Dorow, *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, 107, 4346.

⁷¹ a) H. Gunther, S. Neuman, H. Simon, *J. Biotechnol.*, **1987**, 5, 53; b) H. Simon, J. Bader, H. Gunther, S. Neuman, J. Thanos, *Angew. Chem. Intl. Ed. Engl.*, **1985**, 24, 539; c) S. Tsuboi, E. Nishiyama, M. Utaka, A. Takeda, *Tetrahedron Lett.*, **1986**, 27, 1915.

⁷² a) M.A. Patterson, R.P. Szajewski, G.M. Whitesides, *J. Org. Chem.*, **1981**, 46, 4682; b) Z. Shaked, G.M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, 102, 7104; c) J.R. Matos, M.B. Smith, C.-H. Wong, *Bioorg. Chem.*, **1985**, 13, 121; d) C.-H. Wong, J.R. Matos, *J. Org. Chem.*, **1985**, 50, 1992; e) K. Motosugi, N. Esaki, K. Soda, *Biotechnol. Bioeng.*, **1984**, 26, 805; f) W. Hummel, H. Schutte, M.-R. Kula, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1984**, 434, 195; g) R. Wichmann, C. Wandrey, W. Hummel, H. Schutte, A.F. Buckmann, M.-R. Kula, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1984**, 434, 87; h) M.-J. Kim, G.M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 2959.

moyens directs d'accéder à ce genre de produit avec des rendements raisonnables et des puretés optiques très intéressantes.

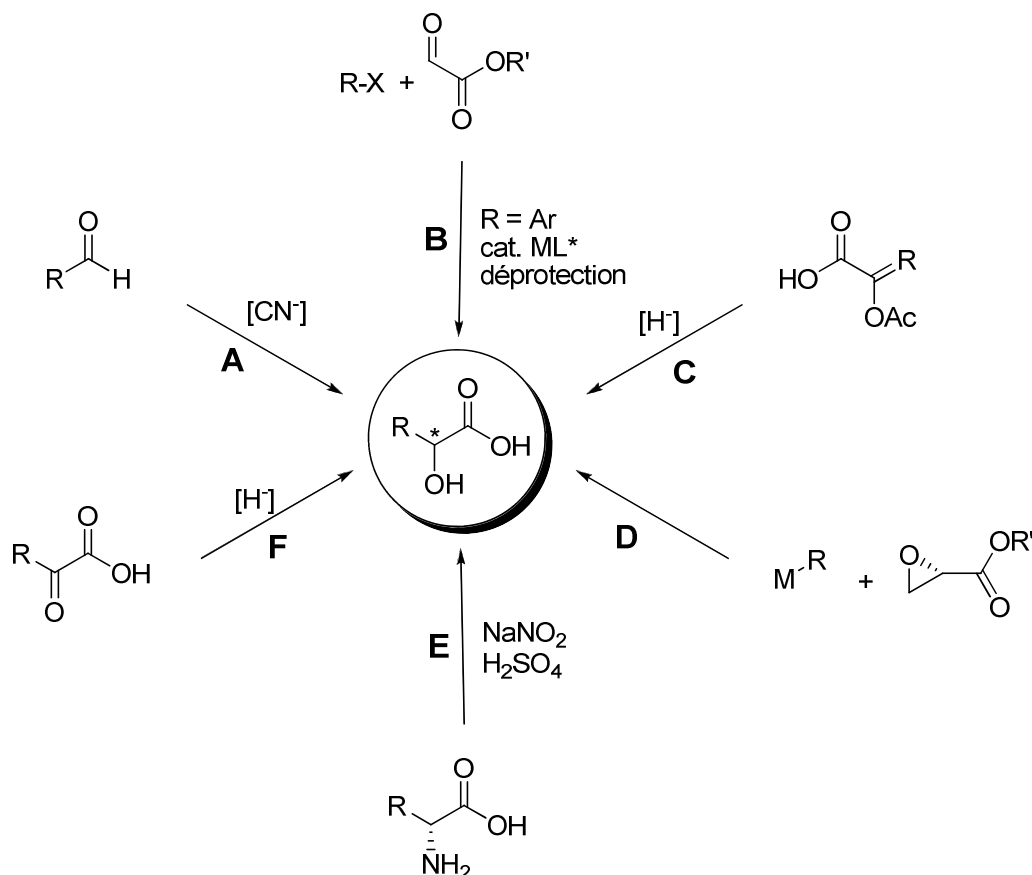


Schéma 26. Six voies d'accès aux α -hydroxyacides optiquement enrichis

Les six principales voies d'obtention des α -hydroxy acides optiquement enrichis utilisées actuellement font appel à des réactions totalement différentes :

- la première voie (**A**) utilise une réaction d'addition énantiosélective d'un équivalent de cyanure sur un aldéhyde suivie d'une hydrolyse⁷³.
- La voie **B** conduit aux α -hydroxyacides par une réaction de Friedel Crafts entre un halogénure aromatique et un ester glyoxylique catalysée par des catalyseurs chiraux⁷⁴.
- Une autre voie (**C**) permet l'obtention des α -hydroxy acides par l'hydrogénation asymétrique d'un acétate d'énol⁷⁵.

⁷³ a) D.H. Dao, M. Okamura, T. Akasaka, Y. Kawai, K. Hida, A. Ohno, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, 9, 2725; b) W. Adam, M. Lazarus, C.R. Saha-Möller, P. Schreier, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, 9, 351; c) Y. Hashimoto, E. Kobayashi, T. Endo, M. Nishiyama, S. Horinouchi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1996**, 60, 1279; d) F. Effenberger, *Angew. Chem. Intl. Ed. Engl.* **1994**, 33, 1555.

⁷⁴ a) N. Gathergood, W. Zhuang, K. A. Jørgensen, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 12517; b) Y. Yuan, X. Wang, X. Li, K. Ding, *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 146.

- La voie **D** propose l'ouverture des époxydes dérivés de l'acide glycidique par des dérivés métalliques nucléophiles⁷⁶.
- La voie **E** propose la synthèse des α -hydroxy acides par le traitement des acides aminés optiquement purs par diazotization suivie d'hydrolyse⁷⁷.
- La dernière voie (**F**) présente l'obtention des mêmes composés par hydrogénation asymétrique des cétoesters correspondants⁷⁸.

Dans ce manuscrit nous allons étudier la voie classique **F**, ainsi qu'une autre voie non décrite au début de ce travail et correspondant à l'insertion des carbenoïdes dans la liaison O-H de l'eau.

III.3. Première réaction cible : La réaction d'insertion des espèces métal-carbénoloïde dans la liaison OH de l'eau

III.3.1. Généralités sur les composés de type diazo et les carbenoïdes⁷⁹

Les composés de type diazo représentent une classe de produits organiques, neutres de point de vue électrique, ayant la particularité d'avoir dans leur structure un groupement fonctionnel N₂ lié à un atome de carbone.

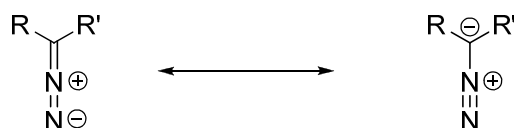


Schéma 27. Structures limites des composés diazo

⁷⁵ M.J. Burk, C.S. Kalberg, A. Pizzano, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 4345.

⁷⁶ a) M. Larcheveque, Y. Petit, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 1993 ; b) K.B. Sharpless, J.M. Chong, *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 4683.

⁷⁷ F.J. Urban, B.S. Moore, *J. Heterocycl. Chem.* **1992**, 29, 431.

⁷⁸ a) C. LeBlond, J. Wang, J. Liu, A.T. Andrews, Y.-K. Sun, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 4920; b) X. Zuo, H. Liu, M. Liu, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 1941; c) H.-U. Blaser, H.-P. Jalett, F. Spindler, *J. Mol. Catal. A: Chem.* **1996**, 107, 85; d) M. Kitamura, T. Ohkuma, S. Inoue, N. Sayo, H. Kumobayashi, S. Akutagawa, T. Ohta, H. Takaya, R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 629.

⁷⁹ a) M.P. Doyle, M.A. McKervey, T. Ye, *Modern Catalytic Methods for Organic Synthesis with Diazo Compounds*, Wiley Interscience, **1998**; b) D.J. Miller, C.J. Moody, *Tetrahedron*, **1995**, 51, 10811.

En ce qui concerne la synthèse des composés de type diazo, nous allons nous limiter aux méthodes de synthèse des composés de type α -diazocarbonyle, composés d'intérêt pour le travail présenté ici (schéma 28).

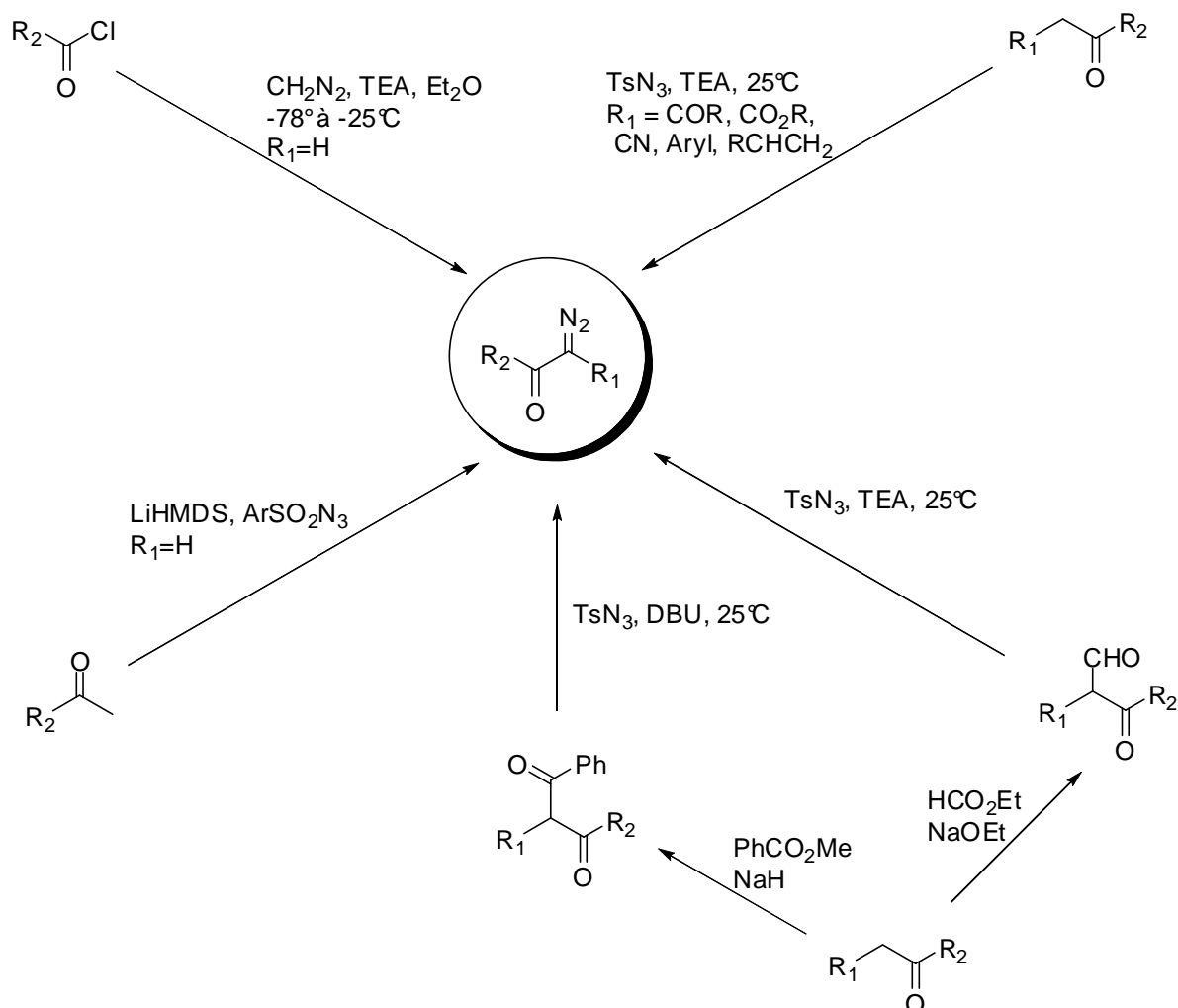


Schéma 28. Principales voies d'accès aux composés α -diazocarbonyles.

La première synthèse d'un tel produit a été réalisée dans les années 1880 par T. Curtius⁸⁰ (diazotization des acides aminés naturels) mais les composés diazo sont devenus vraiment accessibles dans les années 1920 quand F. Arndt et B. Eistert⁸¹ et W. Bradley et R. Robinson⁸² ont publié des méthodes efficaces d'acylation du diazométhane à l'aide des chlorures d'acide.

Probablement la voie la plus intéressante pour accéder à ce type de produit est le transfert du groupement diazo, concept décrit par O. Dimroth en 1910⁸³. Cette méthode repose sur le

⁸⁰ a) T. Curtius, *Ber.*, **1883**, 16, 2230; b) T. Curtius, *J. Prakt. Chem.*, **1888**, 38, 396.

⁸¹ a) F. Arndt, B. Eistert, W. Partale, *Ber.*, 60B, 1364; b) F. Arndt, J. Amende, *Ber.*, **1928**, 61B, 1122; c) F. Arndt, B. Eistert, J. Amende, *Ber.*, **1928**, 1949.

⁸² W. Bradley, R. Robinson, *J. Chem. Soc.*, **1928**, 1310.

⁸³ O. Dimroth, *Ann. Chem.*, **1910**, 373, 336.

transfert du groupement diazo à partir d'un réactif (qui est invariablement un azoture de sulfonyle⁸⁴) à la molécule d'intérêt. Pour que cette méthode soit vraiment efficace synthétiquement il faut que la position méthylène en α du carbonyle soit suffisamment activée pour réagir avec le partenaire donneur. De ce point de vue les substrats peuvent être classés en deux catégories : ceux suffisamment activés pour réagir avec le donneur de diazo et ceux qui nécessitent la présence d'une base faible pour l'activation (ex. β -cétoesters, β -cétoamides, β -dicétones, esters maloniques etc., nécessitent tous la présence de la triéthylamine pour l'activation).

Cette réaction fonctionne très bien pour les substrats où le méthylène à transformer en groupement diazo est flanqué par deux groupements carbonyle, mais pour les substrats n'ayant qu'un seul carbonyle en position α il est nécessaire soit d'optimiser le système donneur de diazo/base soit d'appliquer la technique de transfert de diazo déformylant introduite par M. Regitz⁸⁵. Cette méthode nécessite dans un premier temps une condensation de Claisen du méthylène sur le formiate d'éthyle en présence d'une base suivie d'un transfert de diazo comme décrit précédemment. Il est important de noter que cette procédure peut être effectuée en un seul pot, sans isolation préalable du produit de condensation. Une version de cette méthode a été décrite par M.P. Doyle qui utilise à la place du formiate d'éthyle du trifluoroacétate de trifluoroéthyle⁸⁶. De même, une modification importante de la méthode déformylante de M. Regitz consiste en l'activation du méthylène par benzylation⁸⁷ ou acylation avec de l'oxalate de diéthyle⁸⁸.

Les diazos sont des composés ayant la capacité d'être décomposés en carbènes par différents agents chimiques ou physiques. Ainsi, on peut les décomposer en les chauffant, en les irradiant (photodécomposition), en les mettant en présence d'un acide protique ou d'un acide de Lewis et, finalement, en les mettant en présence d'une quantité catalytique de certains métaux de transition.

Dans ce document nous n'allons détailler que les décompositions catalysées par les complexes de métaux de transition. Pour que ces complexes soient des catalyseurs actifs pour la décomposition des diazos ils doivent être des acides de Lewis, c'est-à-dire être insaturés coordinativement pour permettre une attaque nucléophile du composé diazo. Cette réaction

⁸⁴ M. Regitz, *Synthesis*, **1972**, 351.

⁸⁵ M. Regitz, *Angew. Chem. Intl. Ed. Engl.*, **1967**, 6, 733.

⁸⁶ M.P. Doyle, R.L. Dorow, J.W. Terpstra, R.A. Rodenhouse, *J. Org. Chem.*, **1985**, 50, 1663.

⁸⁷ a) B.W. Metcalf, K. Jund, J.P. Burkhardt, *Tetrahedron Lett.*, **1980**, 21, 15; b) A.D. Abell, M. Brandt, M.A. Levy, D.A. Holt, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1996**, 6, 883.

⁸⁸ a) M. Regitz, F. Menz, *Chem. Ber.*, **1968**, 101, 2622; b) R.E. Harmon, V.K. Sood, S.K. Gupta, *Synthesis*, **1974**, 577.

dépend de deux facteurs, de l'électrophilie du métal de transition et de la stabilité du diazo. Les substituants situés en position α par rapport au groupement diazo jouent un rôle important pour sa stabilité et, par conséquent, pour sa réactivité, comme présenté dans le schéma suivant.

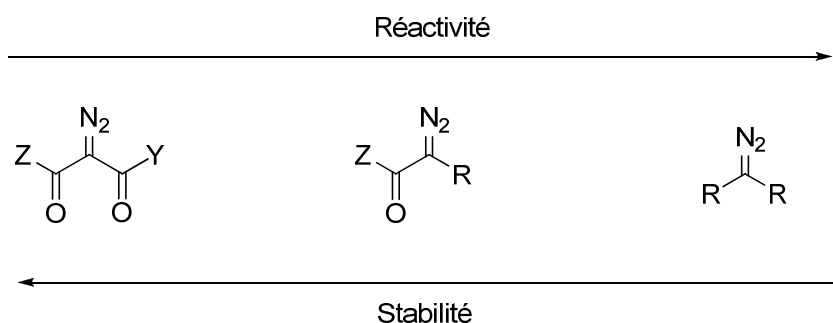


Schéma 29. Evolution de la réactivité et de la stabilité dans une série de composés diazo. Z, Y = R, OR, NR₂, R= alkyl, aryl, H

L'éventuelle présence sur le métal de ligands peut influencer de façon significative la réactivité du carbénoïde généré⁸⁹.

Les métaux capables de réaliser cette transformation sont les métaux de transition insaturés coordinativement et capables de stabiliser le carbénoïde résultant et, dans cette catégorie seulement les métaux de transition situés dans la partie droite du tableau périodique, dans la troisième et la quatrième période (généralement cuivre, cobalt, fer, palladium, rhodium et ruthénium) remplissent ces demandes. Historiquement, le premier métal utilisé pour la décomposition des composés de type diazo a été le cuivre⁹⁰.

Les carbènes générées catalytiquement à partir des composés de type diazo (schéma 31) représentent des intermédiaires d'un grand intérêt en synthèse organique aujourd'hui. Parmi la multitude de réactions que ce type de substrat est capable d'induire, deux réactions sont remarquables : la cyclopropanation des alcènes et les réactions d'insertion dans des liaisons simples. Dans ce document nous n'allons détailler que les réactions d'insertion.

Les composés comportant un groupement fonctionnel de type diazo sont des substrats capables, en présence d'une quantité catalytique de certains métaux de transition de générer une espèce chimique réactive appelée *carbénoïde*.

Ce type de composé a la capacité de s'insérer dans des liaisons carbone – hydrogène ou hétéroatome – hydrogène pour fournir des produits d'insertion comme le montre le schéma suivant.

⁸⁹ A. Padwa, D.J. Austin, *Angew. Chem. Intl. Ed. Engl.*, **1994**, 33, 1797.

⁹⁰ O. Silberrad, C.S. Roy, *J. Chem. Soc.*, **1906**, 89, 179.

- c) attaque nucléophile sur le carbène électrophile pour former un ylure, suivie de transfert d'hydrogène

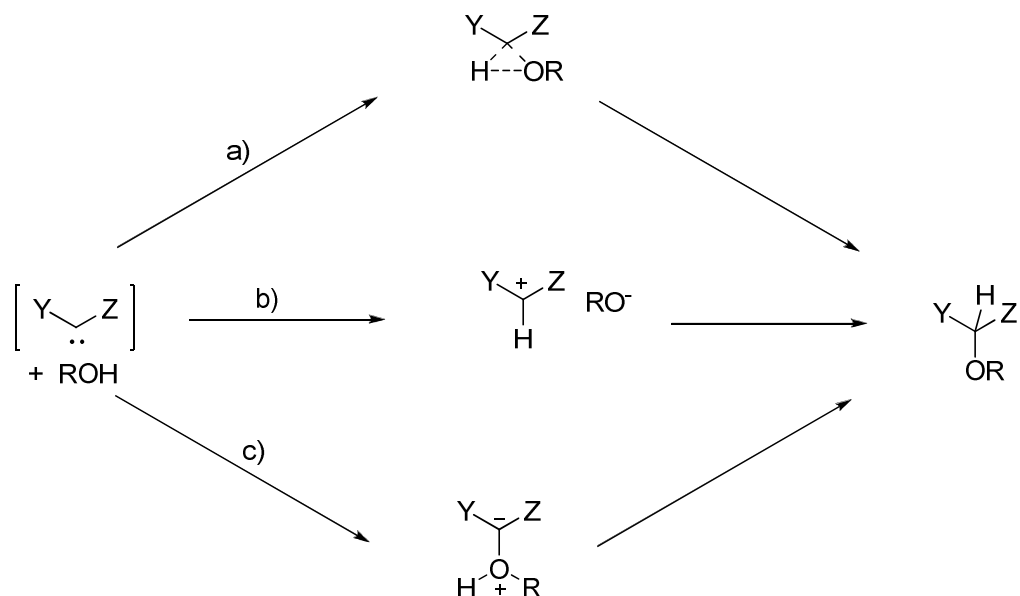


Schéma 32. Hypothèses mécanistiques pour la réaction d'insertion : a) mécanisme concerté; b) mécanisme multi-étapes passant par un intermédiaire de type carbocation ; c) mécanisme multi-étapes passant par un intermédiaire de type ylure

De ces trois propositions de mécanisme, seul le mécanisme empruntant la voie a) semble être le plus favorable à une version asymétrique de la réaction.

Dans le cas de la décomposition des produits de type α -diazo carbonyle catalysée par le rhodium (II), malgré les recherches intenses menées dans le domaine⁹¹ on ne peut pas proposer aujourd'hui de mécanisme avec certitude. Le mécanisme généralement accepté est une adaptation de celui proposé par P. Yates pour la décomposition en présence du cuivre des diazocétones⁹². Ainsi, selon ce type de mécanisme, l'atome de carbone polarisé négativement va se complexer au site axial du catalyseur à base de rhodium, au cours de la première étape.

La seconde étape considérée comme limitante⁹³, correspond à la perte de la molécule d'azote. Des études cinétiques⁹⁴ ont donné des arguments en faveur de cette hypothèse. De

⁹¹ a) D.F. Taber, R.E. Ruckle Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, 7686; b) M.C. Pirrung, A.T. Morehead Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 8991; c) M.P. Doyle, L.J. Westrum, W.N.E. Wolthuis, M.M. See, W.P. Boone, V. Bagheri, M.M. Pearson, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 958.

⁹² P. Yates, *J. Am. Chem. Soc.*, **1952**, 74, 5376.

⁹³ F.M. Wong, J. Wang, A.C. Hengge, W. Wu, *Org. Lett.*, **2007**, 9, 1663.

⁹⁴ a) A.J. Aniciaux, A.J. Hubert, A.F. Noels, N. Petiniot, P. Teyssié, *J. Org. Chem.*, **1980**, 45, 695; b) M.E. Alonso, M. Garcia, C. Del, *Tetrahedron*, **1989**, 45, 69; c) M.C. Pirrung, H. Liu, A.T. Morehead Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 8162; d) M.C. Pirrung, H. Liu, A.T. Morehead Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 1014.

même, une étude menée sur une série de α -diazophénylacétates⁹⁵ conduit à une détermination d'un coefficient de Hammett ρ négatif ce qui est en accord avec cette hypothèse.

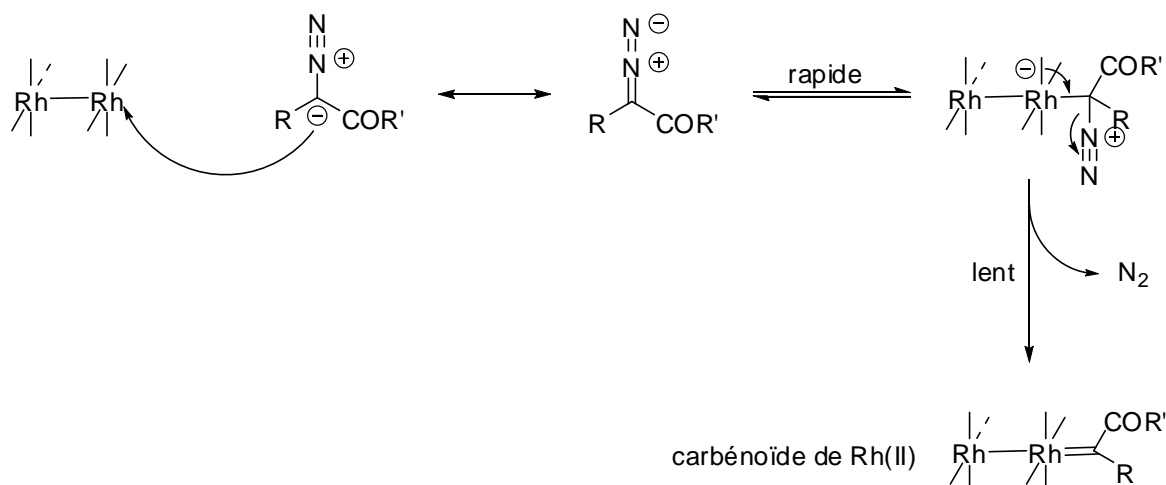


Schéma 33. Mécanisme probable pour la formation du carbénoïde de rhodium (II)

Les intermédiaires réactionnels de type diazonium présentés dans la figure précédente ont déjà été mis en évidence par spectroscopie optique et de RMN⁹⁶.

Les composés α -diazocarbonyl peuvent s'insérer dans la liaison O-H de l'eau, des alcools, des phénols et des acides carboxyliques et sulfoniques (schéma 34).

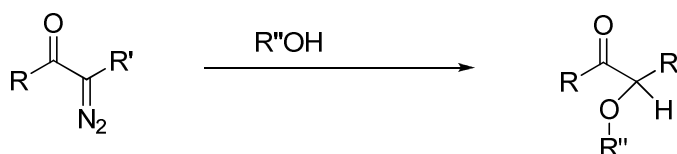


Schéma 34. R''=H, alkyl, aryl, RCO, RSO₃

Les réactions de ces composés avec les alcools présentent un grand intérêt synthétique, spécialement pour la préparation des α -alkoxycétones ou α -alkoxyesters chiraux. Dans la littérature, les réactions avec l'eau et les phénols sont moins bien répertoriées quoi que récemment on a pu voir un intérêt croissant pour ces deux transformations.

Probablement le premier exemple de réaction d'insertion dans une liaison O-H catalysé par un métal de transition est celui décrit par R. Casanova et T. Reichstein, qui ont décrit la

⁹⁵ Z. Qu, W. Shi, J. Wang, *J. Org. Chem.*, **2001**, 66, 8139.

⁹⁶ J.L. Maxwell, K.C. Brown, D.W. Bartley, T. Kodadek, *Science*, **1992**, 256, 1544.

transformation d'une diazocétone en α -méthoxycétone en présence de méthanol et d'une quantité catalytique d'oxyde de cuivre (I)⁹⁷.

Une étape importante dans le développement de cette réaction correspond à la découverte, en 1973, par un groupe belge, de la catalyse au rhodium pour les réactions d'insertion d'alcools et de l'eau⁹⁸. Ce même groupe a publié, plus tard, le même type de catalyse au rhodium pour la réaction d'insertion de l'éthyldiazoacétate dans la liaison O-H du phénol pour fournir le phénoxyacétate avec un rendement de l'ordre de 90%⁹⁹.

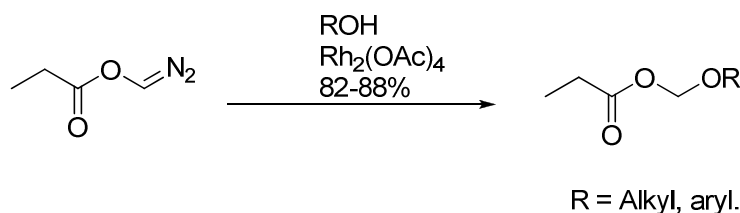


Schéma 35. Réaction d'insertion dans la liaison OH de l'eau, des alcools et des phénols catalysée par le rhodium

Malgré le potentiel synthétique énorme de cette réaction, peu d'applications en synthèse asymétrique sont disponibles dans la littérature. On peut citer ici un exemple publié en 1995 où le rhodium acétate catalyse l'insertion d'un β -cétoester dans la liaison O-H du (*S*)-3-buten-2-ol pour former un intermédiaire de type éther allylique qui subit in situ un réarrangement sigmatropique pour fournir l'alcool tertiaire final avec un excès énantiomérique de 92%¹⁰⁰ schéma 36.

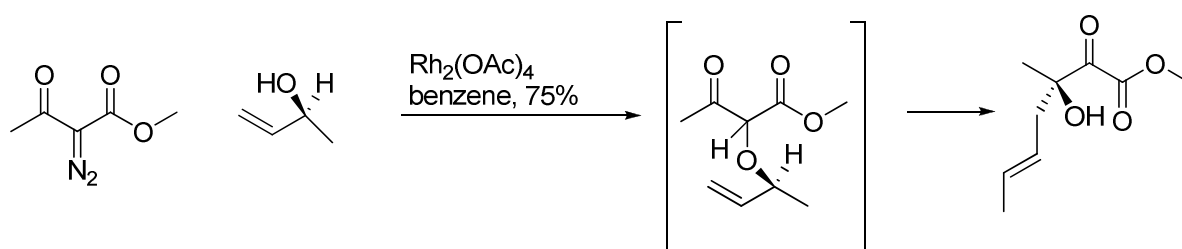


Schéma 36. Premier exemple d'insertion « asymétrique » dans une liaison OH catalysée par le rhodium

Cet exemple est aussi important pour un autre aspect : la compétition entre la réaction d'insertion et de cyclopropanation, qui est en faveur de la réaction d'insertion. Cette tendance a été par la suite confirmée à plusieurs reprises⁹⁶.

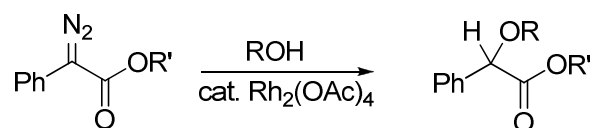
⁹⁷ R. Casanova, T. Reichstein, *Helv. Chim. Acta*, **1950**, 33, 417.

⁹⁸ R. Paulissen, H. Reimlinger, E. Hayez, A.J. Hubert, P. Teyssié, *Tetrahedron Lett.*, **1973**, 2233.

⁹⁹ A.F. Noels, A. Demonceau, N. Petiniot, A.J. Hubert, P. Teyssié, *Tetrahedron*, **1982**, 38, 2733.

¹⁰⁰ J.L. Wood, B.M. Stoltz, H.-J. Dietrich, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 10413.

Une autre approche pour l'utilisation de cette réaction en synthèse asymétrique a été proposée par C. Moody qui utilise un auxiliaire chiral pour obtenir des produits d'insertion diastéréomériques¹⁰¹ (tableau 2).



Entrée	R'	R	Rendement (%)	rd	Isomère majoritaire
1		Me	95	52 :48	n.d.
2		H	84	50 :50	n.d.
		Me	75	54 :56	<i>S</i>
		iPr	82	62 :38	<i>S</i>
3		H	79	66 :34	<i>R</i>
		Me	63	72 :28	<i>R</i>
		iPr	85	68 :32	<i>R</i>
		tBu	40	76 :24	<i>R</i>
4		H	85	75 :25	<i>S</i>
		iPr	71	71 :29	<i>R</i>
5		Me	98	66 :34	<i>R</i>
		iPr	82	74 :26	<i>R</i>
		tBu	37	75 :25	<i>R</i>

Tableau 2. Préparation asymétrique d' α -alkoxyesters à partir de diazoesters chiraux

Y. Landais, dans une étude¹⁰² publiée en 1997, décrit deux stratégies d'obtention des produits d'insertion de manière énantiosélective : la première, consiste à utiliser un auxiliaire chiral dérivé de la pantolactone.

Deux partenaires hydroxyl ont été testés : l'eau, qui a fourni le produit hydroxy correspondant avec un rendement chimique de 75% et un excès diastéréomérique (ed) de 50% et le méthanol qui a fourni l'éther méthoxy attendu avec un rendement de 75% et un ed de seulement 5%.

¹⁰¹ E. Aller, D.S. Brown, G.G. Cox, D.J. Miller, C.J. Moody, *J. Org. Chem.*, **1995**, 60, 4449.

¹⁰² P. Bulugahapitya, Y. Landais, L. Parra-Rapado, D. Planchenault, V. Weber, *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 1630.

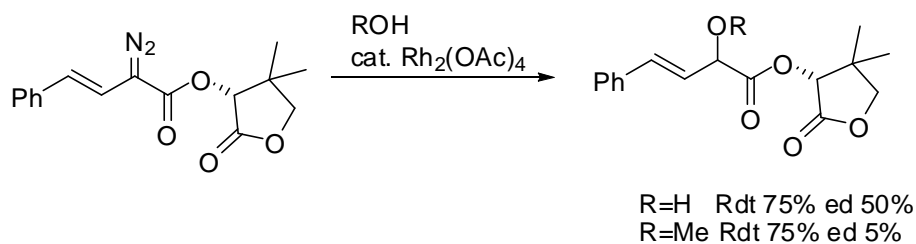


Schéma 37. Insertion énantiosélective catalysée par le rhodium en présence d'un auxiliaire chiral pantolactone

La deuxième stratégie décrite dans cet article représente le premier exemple de catalyse asymétrique pour cette réaction d'insertion dans la liaison O-H utilisant un catalyseur chiral. Malgré le rendement moyen de 59%, et la très faible valeur de l'*ee* il s'agit du premier exemple prouvant qu'il est possible d'insérer de façon asymétrique des carbénoïdes dans des liaisons OH à l'aide de catalyseurs chiraux.

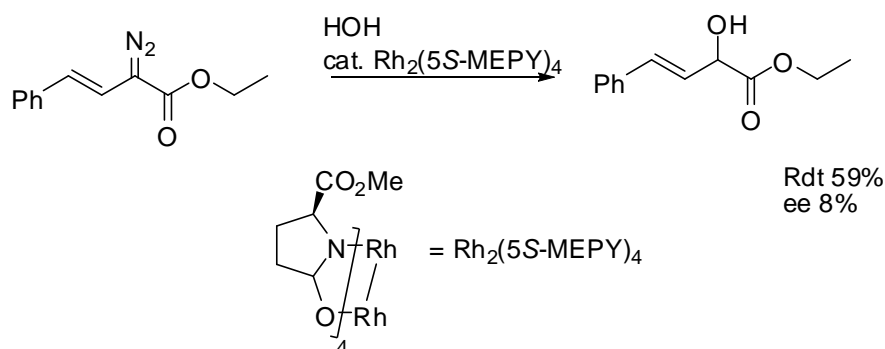


Schéma 38. Premier exemple d'insertion énantiosélective dans des liaisons OH à l'aide d'un catalyseur chiral sur un substrat prochiral (Y. Landais, 1997).

En s'inspirant du travail précédent, M.P. Doyle propose en 2002¹⁰³ d'associer un auxiliaire chiral à un catalyseur asymétrique. En utilisant le $\text{Rh}_2(4R\text{-MEAZ})_4$ en tant que catalyseur, l'auteur réalise l'insertion du composé diazo dans des liaisons OH avec des rendements très corrects et des *ed* intéressants.

¹⁰³ M.P. Doyle, M. Yan, *Tetrahedron Lett.* **2002**, 5929.

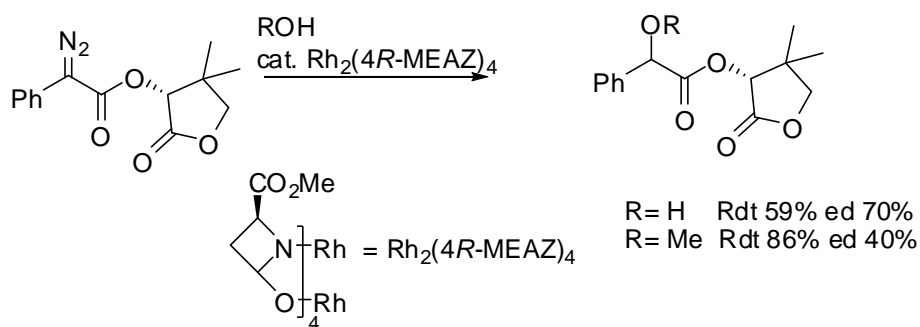


Schéma 39. Association d'un auxiliaire chiral (pantolactone) et d'un catalyseur asymétrique

Peu après le début de nos travaux dans ce domaine, l'équipe de G. Fu a publié ce qui correspond au deuxième article¹⁰⁴ sur l'insertion catalytique énantiosélective dans lequel est décrite la conversion du phényldiazoacétate à l'aide d'un catalyseur à base de cuivre complexé par des ligands chiraux de type bis-aza ferrocène en présence d'alcools en produits d'insertion correspondants avec des rendements chimiques allant jusqu'à 94% et des *ee* jusqu'à 90%. Dans l'étude d'optimisation du substrat, G. Fu a trouvé qu'en utilisant un substrat diazo fluoré les rendements et les *ee* peuvent être améliorés jusqu'à des valeurs de 98%. En revanche, pour la réaction d'insertion dans la liaison O-H de l'eau, le système catalytique proposé par les auteurs conduit à des résultats modestes, avec un rendement moyen de 55% et un *ee* faible de 15%.

Cet exemple représentait à l'époque le meilleur système catalytique pour l'insertion des carbénoïdes dans la liaison O-H de l'eau.

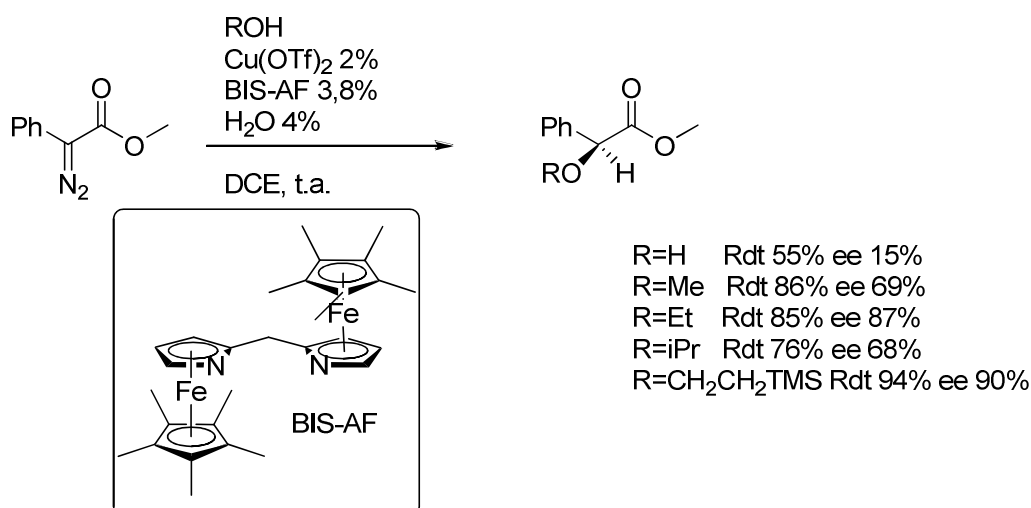


Schéma 40. Insertion énantiosélective dans la liaison OH de l'eau et des alcools à l'aide du catalyseur asymétrique décrit par G. Fu.

¹⁰⁴ T.C. Maier, G. Fu, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 4594.

III.3.3 Criblage de catalyseurs pour la réaction énantiosélective d'insertion d'espèces métal-carbénoloïde dans la liaison OH de l'eau

Notre intérêt pour la synthèse des α -hydroxy acides utilisant la réaction énantiosélective d'insertion d'espèces métal-carbénoloïde dans la liaison OH de l'eau est justifié par le fait que l'eau représente un réactif non dangereux, respectueux de l'environnement et très peu onéreux. De façon globale, cette réaction utilisant de l'eau comme réactif et de l'azote comme seul sous-produit est très intéressante et correspond parfaitement aux besoins de la chimie organique de synthèse moderne¹⁰⁵. Par contre, les processus énantiosélectifs efficaces utilisant l'eau comme réactif disponibles dans la littérature restent très peu nombreux, la taille réduite de cette molécule la rendant difficilement contrôlable dans un processus stéréosélectif¹⁰⁶.

a) Criblage des métaux de transition

Afin d'explorer les possibilités offertes par cette réaction nous avons décidé d'effectuer, dans un premier temps, un criblage des métaux susceptibles de catalyser cette transformation.

Théoriquement, tous les métaux de transition situés dans la partie droite du tableau périodique sont susceptibles de catalyser la décomposition des composés de type α -diazocarbonyl. Pour tester si cette hypothèse s'applique avec succès à la réaction d'insertion dans la liaison OH de l'eau nous avons effectué un criblage de quelques espèces métalliques susceptibles de conduire à des résultats intéressants.

Période										
4	²¹ Sc	²² Ti	²³ V	²⁴ Cr	²⁵ Mn	²⁶ Fe	²⁷ Co	²⁸ Ni	²⁹ Cu	³⁰ Zn
5	³⁹ Y	⁴⁰ Zr	⁴¹ Nb	⁴² Mo	⁴³ Tc	⁴⁴ Ru	⁴⁵ Rh	⁴⁶ Pd	⁴⁷ Ag	⁴⁸ Cd
6	Lanthanides	⁷² Hf	⁷³ Ta	⁷⁴ W	⁷⁵ Re	⁷⁶ Os	⁷⁷ Ir	⁷⁸ Pt	⁷⁹ Au	⁸⁰ Hg

Figure 27. Extrait du tableau périodique des éléments avec mise en évidence des 12 métaux de transition susceptibles de catalyser des réactions de décomposition des composés de type diazo

¹⁰⁵ C.J. Li, T.-H. Chen, *Organic Reactions in Aqueous Media*, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, **1997**.

¹⁰⁶ a) H. Alper, N. Hamel, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2803; b) M. Tokunaga, J.F. Larrow, F. Kakiuchi, E.N. Jacobsen, *Science* **1997**, *277*, 936; c) A. El-Qisairi, O. Hamed, P.M. Henry, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 2790.

Dans un premier temps nous avons synthétisé le substrat diazo comportant un groupement *tert*-butyl en position *para*. Ce composé sera notre substrat modèle et formera, suite à la réaction, le produit *p*-*t*Bu-MA pouvant être détecté par le test immunoanalytique.

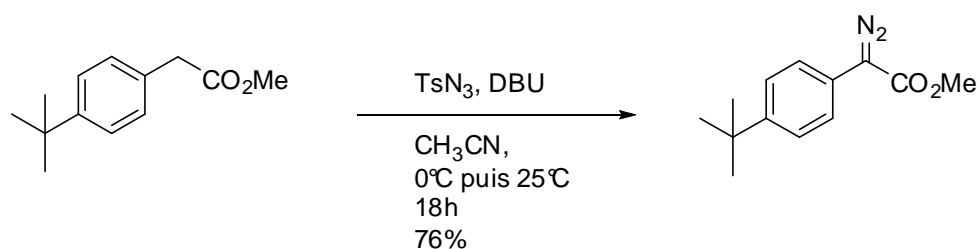


Schéma 41. Synthèse du *para-tert*-butyl-phényldiazoacétate de méthyle

La synthèse de ce produit diazo est aisée, en une étape, à partir de *para-tert*-butyl-phénylacétate de méthyle, qui, après avoir réagit avec la DBU et l'azoture de *para*-toluène sulfonyle, fournit le produit envisagé avec un rendement de 76%.

Trois équivalents d'eau sont utilisés pour cette transformation et la charge catalytique utilisée pour la procédure standard de criblage est de 5% mole.

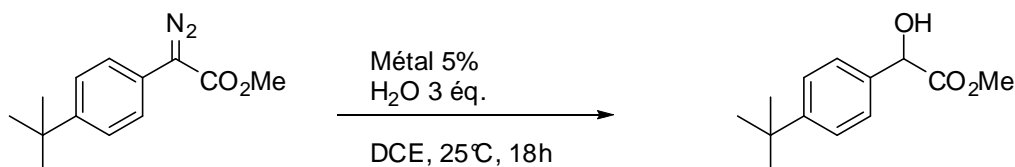


Schéma 42. Réaction cible utilisée pour le criblage des catalyseurs métalliques

Les 12 métaux susceptibles de catalyser cette réaction ont été criblés. Pour la plupart d'entre eux plusieurs sels inorganiques ont été testés et quelques complexes organométalliques ont aussi été utilisés.

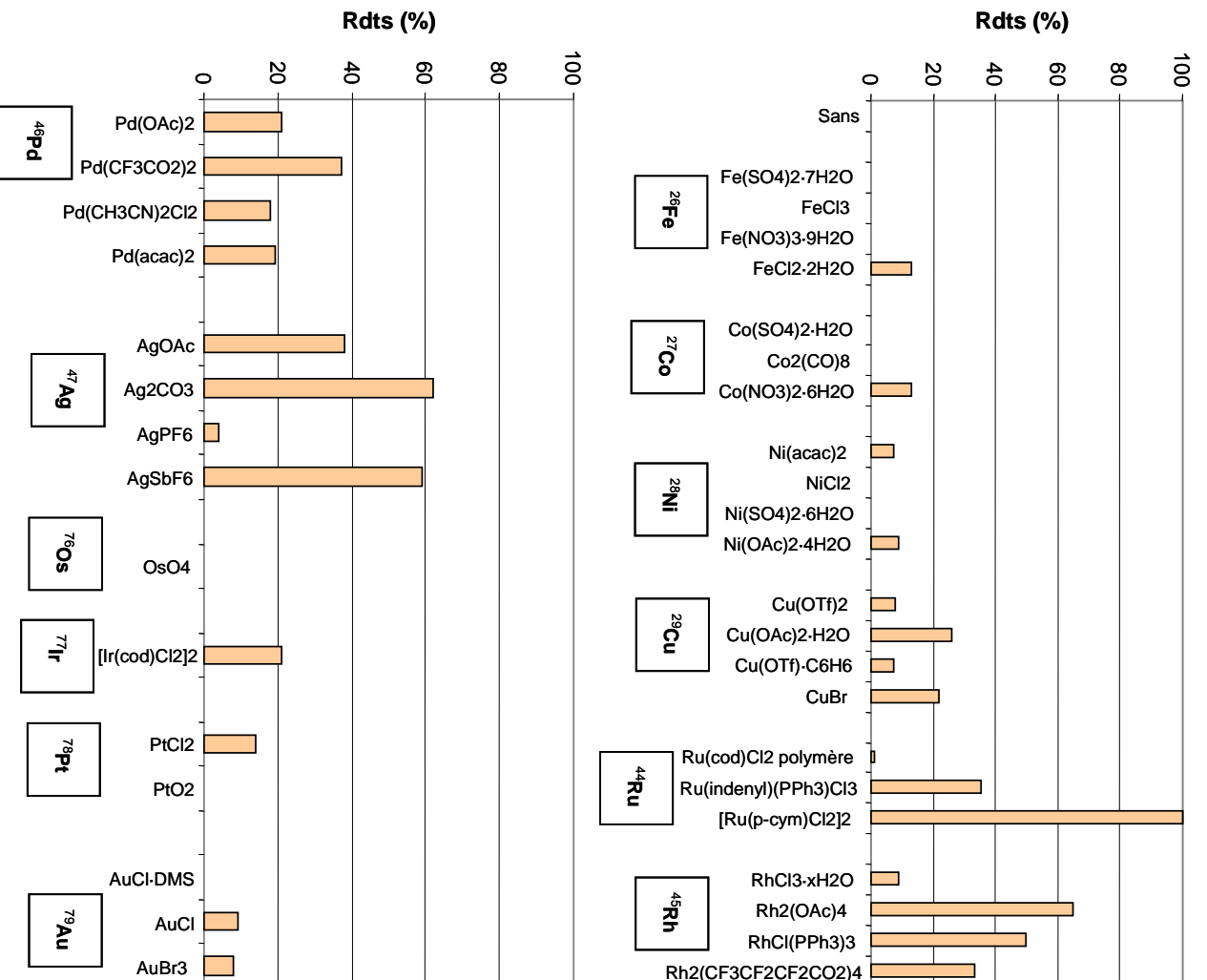


Figure 28. Criblage de catalyseurs métalliques pour la réaction d'insertion dans la liaison OH de l'eau

Ce premier criblage (38 expériences) montre que, pour chaque métal testé, il y a au moins une espèce capable de catalyser cette transformation. Cette information est d'une grande importance car on sait que les ligands organiques complexés par les métaux peuvent activer ou désactiver ces derniers par rapport à une transformation catalytique d'un substrat. La seule exception est l'osmium, mais dans ce cas nous n'avons testé que le tetracétate d'osmium (IV).

Par contre, dans la littérature il existe de nombreux exemples de décompositions de composés de type diazo par des catalyseurs à base d'osmium¹⁰⁷.

Parmi les systèmes criblés on observe clairement que le catalyseur le plus efficace pour cette transformation est le $[\text{Ru}(p\text{-cym})\text{Cl}_2]_2$, la conversion du substrat en α -hydroxyacide étant totale dans ce cas. De façon plus globale, on peut constater que les complexes de ruthénium, rhodium, palladium, argent et de cuivre sont les plus efficaces parmi ceux testés dans cette étude. A la vue des résultats obtenus avec le catalyseur $[\text{Ru}(p\text{-cym})\text{Cl}_2]_2$ nous avons voulu dans un premier temps explorer le potentiel de ce catalyseur.

b) Catalyse par le ruthénium

A ce jour, très peu d'exemples sont disponibles dans la littérature pour des réactions d'insertion des carbénoïdes de ruthénium dans des liaisons oxygène-hydrogène. Le premier exemple a été publié en 1996 quand une équipe indienne a prouvé que le $\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3$ était un bon catalyseur pour les réactions d'insertion d'une α -diazoacétophénone dans les liaisons O-H du méthanol (70%) et du phénol (74%)¹⁰⁸. Des conditions de température relativement élevées sont toutefois nécessaires (schéma 43).

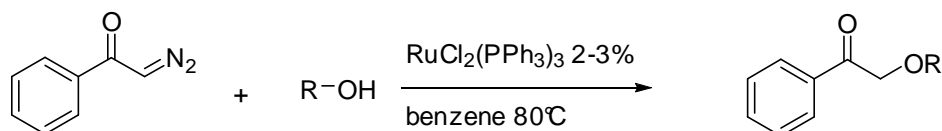


Schéma 43. Insertion des carbénoïdes de ruthénium dans des liaisons OH

L'autre exemple disponible à cette date concerne l'insertion du diazoacétate d'éthyle dans la liaison O-H de l'eau et d'alcools, catalysée par des complexes de ruthénium monomère obtenus avec des ligands de type diamines sulfonées, avec des rendements compris entre 75 et 95%¹⁰⁹.

¹⁰⁷ a) D.A. Smith, D.N. Reynolds, L.K. Woo, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 2511; b) A. Demonceau, C.A. Lemoine, A.F. Noels, I.T. Chizhevsky, P.V. Sorokin, *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 8419; c) A. Demonceau, C.A. Lemoine, A.F. Noels, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 1025.

¹⁰⁸ S. Sengupta, D. Das, D. Sen Sarma, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 8815.

¹⁰⁹ F. Simal, A. Demonceau, A.F. Noels, *Tetrahedron Lett.*, **1999**, 40, 63.

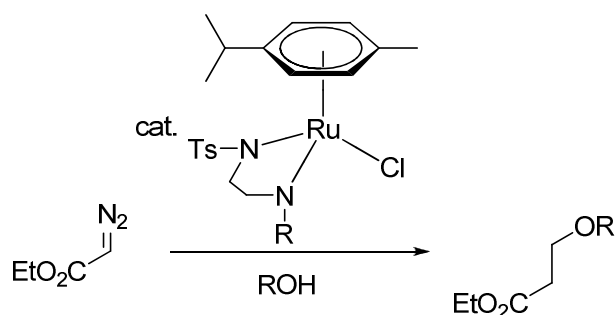
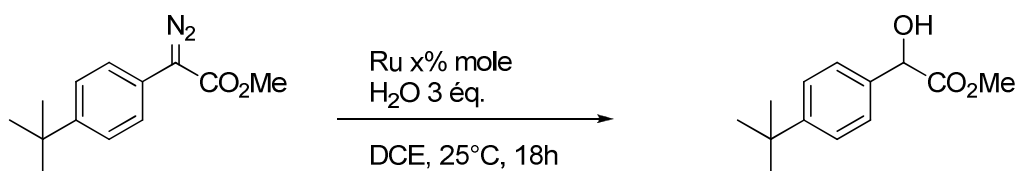


Schéma 44. Insertions de carbenoïdes de ruthénium dans des liaisons OH

Suite à ces observations nous avons décidé d'effectuer une étude plus approfondie des quelques sels de ruthénium disponibles commercialement. La réaction test est la même que celle utilisée précédemment pour le criblage des catalyseurs métalliques.



Entrée	Complexe de ruthénium	Charge catalytique (mole %)	Rendement (%)
1	Ru(bipy) ₂ Cl ₂	5	0
2	Ru(indényl)(PPh ₃)Cl ₃	5	30
3	RuCl ₂ (NH ₃) ₆	5	0
4	RuClCp(PPh ₃)	5	28
5	Ru(cod)Cl ₂ polymère	5	0
6	Ru(<i>p</i> -cym)Cl ₂] ₂	5	100
7	Ru(<i>p</i> -cym)Cl ₂] ₂	2	100
8	Ru(<i>p</i> -cym)Cl ₂] ₂	1	91
9	Ru(<i>p</i> -cym)Cl ₂] ₂	0,5	89
10	Ru(<i>p</i> -cym)Cl ₂] ₂	0,1	62
11	Ru(<i>p</i> -cym)Cl ₂] ₂	0,01	3

Tableau 3. Test de quelques sels de ruthénium disponibles commercialement

Parmi ces six complexes de ruthénium le dimère du dichloro(*para*)cymène ruthénium (II) est, de loin, le catalyseur le plus actif. A 5% mole de charge catalytique la transformation du substrat diazo en α -hydroxyester est complète en moins de 30 sec. Nous avons alors voulu savoir

jusqu'où on pourrait diminuer cette charge catalytique afin de rendre la réaction encore plus économique en catalyseur.

L'étude faite en variant cette charge catalytique entre 0,01% et 5% mole/mole montre qu'en réduisant cette charge jusqu'à 0,5% les rendements restent très corrects.

Suite à ces résultats encourageants, nous avons voulu explorer la généralité de ce catalyseur. Pour cela, une série de composés diazo a dans un premier temps été synthétisée (schéma 45).

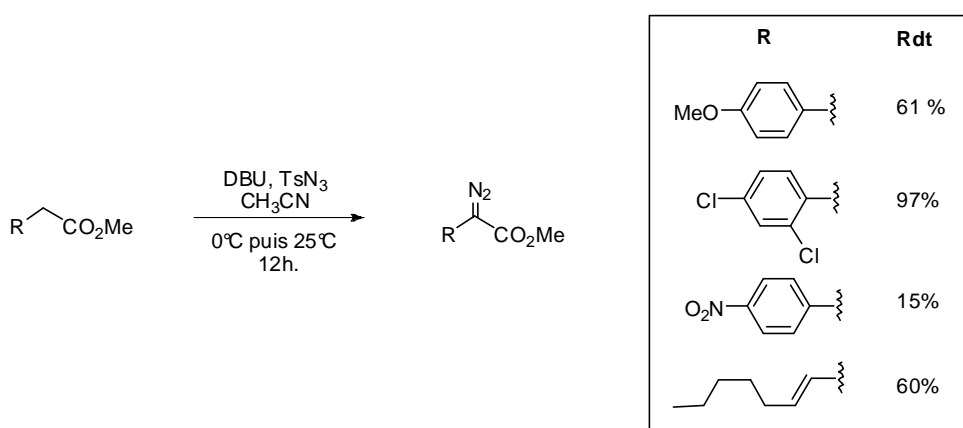


Schéma 45. Synthèse de quatre dérivés diazo.

Nous avons alors mis à réagir certains de ces composés diazo en présence de trois équivalents d'eau et une quantité catalytique de catalyseur $[\text{Ru}(p\text{-cym})\text{Cl}_2]_2$. Les résultats obtenus sont résumés dans le schéma 46.

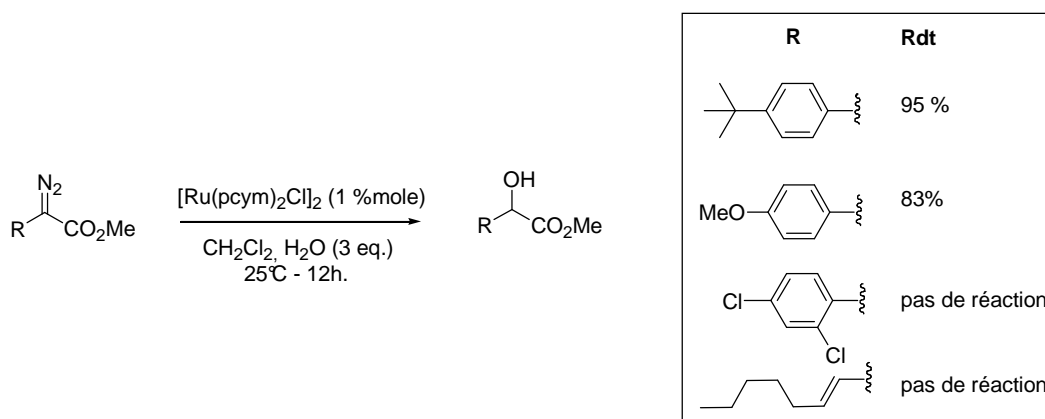


Schéma 46. Réaction de quatre dérivés diazo en présence d'eau et de $[\text{Ru}(p\text{-cym})\text{Cl}_2]_2$.

Malheureusement ces premières expériences tentent à montrer que ce complexe de ruthénium n'est pas général puisqu'il ne semble être efficace que vis à vis des dérivés diazo comportant un groupement aromatique riche électroniquement. Le substrat dichloré ou le substrat comportant une double liaison sont retrouvés intacts après l'expérience et l'ajout de quantité croissante de catalyseur n'améliore pas le résultat.

Nous avons alors voulu voir si ce catalyseur pouvait présenter un intérêt pour la préparation d' α -hydroxy esters énantiomériquement enrichis. Dans un premier temps, nous avons décidé de synthétiser un composé diazo présentant un groupement chiral sur la fonction ester située en position α . Notre choix s'est naturellement tourné vers les esters de pantolactone qui d'après la littérature sont les plus aptes à réaliser une induction asymétrique (voir partie introductive de ce chapitre). La préparation de ces composés s'est inspirée des procédés décrits dans la littérature.¹¹⁰

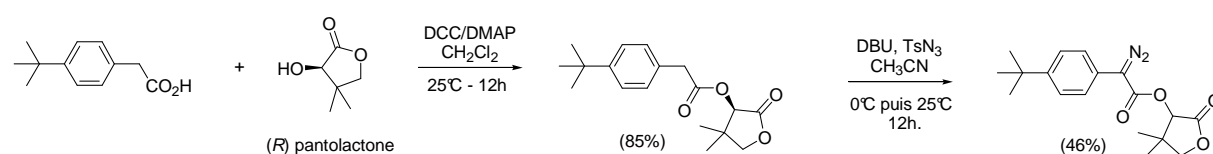


Schéma 47. Synthèse d'un α -diazo ester de pantolactone.

Si la préparation du composé diazo souhaité n'a pas posé de difficulté majeure, nous avons observé en revanche une complète racémisation du produit lors de l'étape de transfert de diazo probablement liée aux conditions basiques de cette réaction (présence de DBU). L'injection en CLHP sur colonne chirale du composé diazo montre bien deux pics d'égale intensité, ce résultat décevant est intrigant puisqu'il n'a pas été mentionné dans la littérature dans les mêmes conditions de réaction.

Nous avons alors voulu former un complexe de ruthénium chiral et pour cela nous avons synthétisé, à partir du complexe dimérique de ruthénium un complexe chiral, comportant des ligands chiraux de type pyridine bis-oxazoline, selon un procédé décrit dans la littérature¹¹¹.

¹¹⁰ P. Bulugahapitiya, Y. Landais, L. Parra-Rapado, D. Planchenault, V. Weber. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 1630.

¹¹¹ H. Nishiyama, Y. Itoh, H. Matsumoto, S.-B. Park, K. Itoh, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 2223.

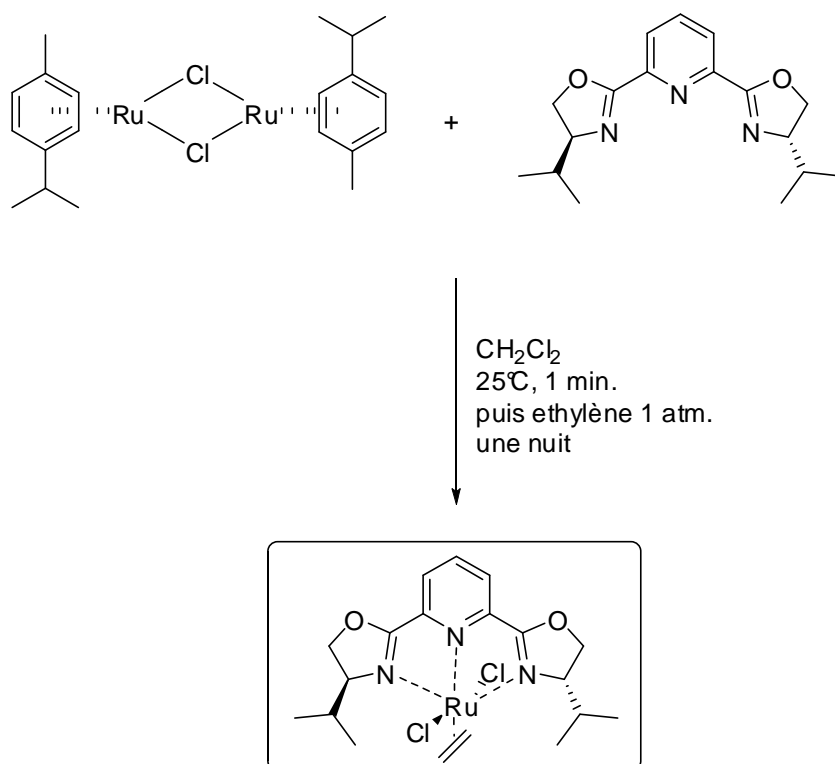


Schéma 48. Synthèse du catalyseur chiral de ruthénium

Un essai de catalyse asymétrique de la réaction d'insertion dans la liaison OH de l'eau a été alors conduit en présence de 5% (mole/mole) de ce complexe chiral n'a pas fourni le produit attendu, aucune réaction n'étant observée.

L'ensemble plutôt décevant de ces résultats nous a conduit à explorer cette réaction avec d'autres espèces métalliques.

c) Catalyse par le rhodium

Dans la littérature, le catalyseur métallique de choix pour les réactions de décomposition des composés de type diazo est à base rhodium (II) dimère. Les composés de type dirhodium(II) tetraacétate ont été synthétisés dans les années 1960¹¹² et leur application en tant que catalyseur pour les réactions de décomposition de composés diazo a été introduite en 1973 par Ph. Teyssié¹¹³.

Ce type de catalyseur a l'avantage d'être très actif (charge catalytique généralement inférieure à 2%) et de pouvoir accepter une variété large de ligands de type carboxylate et

¹¹² a) L. Nazarova, I.I. Chernyaev, A.S. Morozova, *Zh. Neorgan. Khim.*, **1965**, 10, 539; b) F.A. Cotton, N.F. Curtis, C.B. Harris, B.F.G. Johnson, S.J. Lippard, J.T. Mague, W.R. Robinson, J.S. Wood, *Science*, **1964**, 145, 1305.

¹¹³ R. Paulissen, H. Reimlinger, E. Hayez, A.J. Hubert, Ph. Teyssié, *Tetrahedron Lett.*, **1973**, 2233.

carboxamidate pontés ce qui permet une modulation de la réactivité et de la sélectivité difficilement atteignable avec les catalyseurs à base de cuivre et de palladium.

De même la géométrie des complexes à base de rhodium(II) est favorable à ce type de réaction, chaque rhodium présentant une géométrie octaédrique. Vue « de profil » la molécule à l'apparence d'une couronne riche en électrons aux extrémités et pauvre au centre, au niveau de l'atome de rhodium, comme présenté dans le schéma suivant.

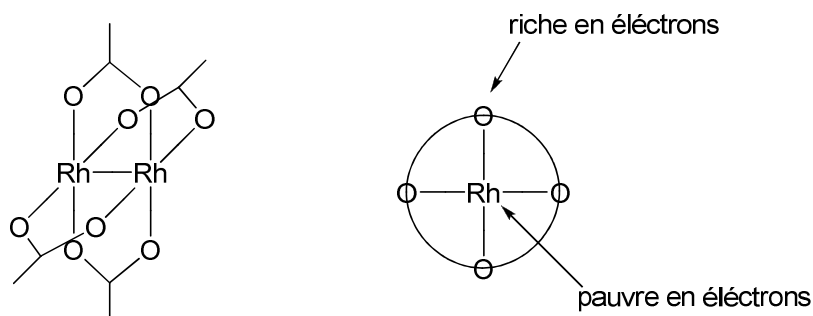


Schéma 49. Vue globale et latérale d'une molécule de tétraacétate de dirhodium(II).

Nous avons choisi comme catalyseur des sels de rhodium(II) complexés par des ligands chiraux couramment utilisés en catalyse asymétrique et commercialement disponibles, ils ont été utilisés à 2% mole/mole. Le rhodium (II) tétraacétate est utilisé comme catalyseur de référence. Les structures des catalyseurs sont présentées dans le schéma 50.

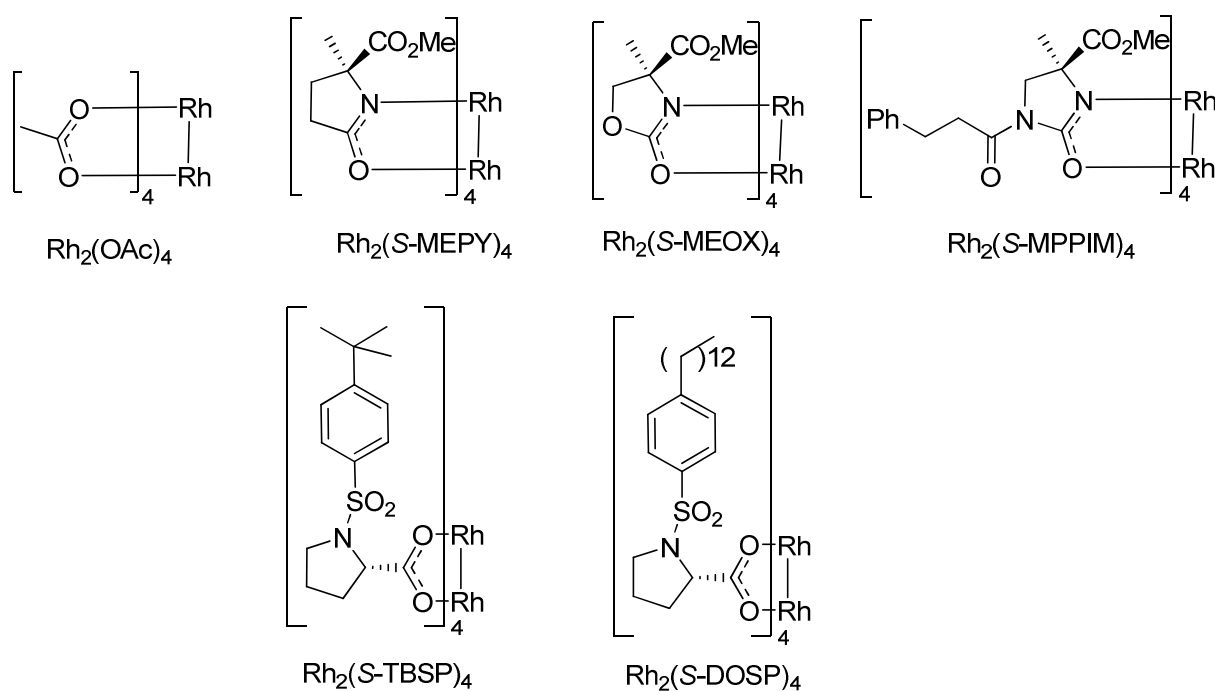
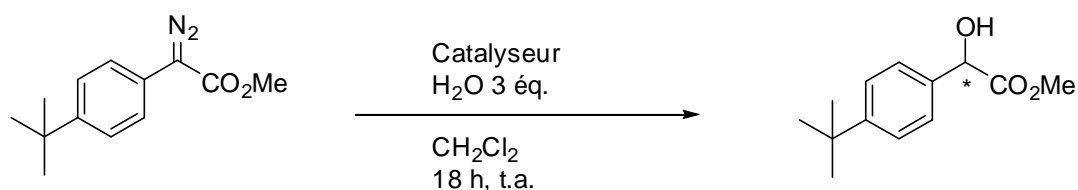


Schéma 50. Catalyseurs à base de rhodium(II) utilisés pour la réaction d'insertion

Tous les catalyseurs ont été testés pour la réaction d'insertion du 2-(4-*tert*-butylphényl)-2-diazoacétate de méthyle dans la liaison OH et les résultats sont présentés dans le tableau 4.



Entr\u00e9e	Catalyseur	Rendement (%)	ee (%)
1	Rh ₂ (OAc) ₄	65	0
2	Rh-MEPY	13	0
3	Rh-MEOX	7	0
4	Rh-MPPIM	15	0
5	Rh-TBSP	62	0
6	Rh-DOSP	81	0

Tableau 4. R\u00e9sultats obtenus pour la catalyse au rhodium

L'aspect le plus important de ce criblage est probablement le fait que, malheureusement, aucun catalyseur n'a conduit \u00e0 un produit optiquement actif. On peut observer que l'ac\u00e9tate de rhodium(II), que l'on utilise comme r\u00e9f\u00e9rence, est un catalyseur relativement actif pour cette r\u00e9action, ainsi que le Rh₂(*S*-TBSP)₄ et le Rh₂(*S*-DOSP)₄. Les catalyseurs portant des ligands MEPY, MEOX et MPPIM, qui sont des ligands de type carboxamidate au contraire des trois autres qui sont de type carboxylate, semblent moins efficaces pour la r\u00e9action par rapport \u00e0 la r\u00e9f\u00e9rence.

Ces r\u00e9sultats sont peu encourageants et nous renvoient aux probl\u00e8mes d'ordre m\u00e9canistique. En effet, comme mentionn\u00e9 dans l'introduction de ce chapitre, trois chemins r\u00e9actionnels peuvent \u00eatre envisag\u00e9s au cours de la r\u00e9action catalys\u00e9e par le rhodium. Or, il est probable que le m\u00e9canisme concert\u00e9 peut conduire \u00e0 la formation d'un produit \u00e9nantiom\u00e9riquement enrichi. Ces r\u00e9sultats tentent de montrer que ce m\u00e9canisme n'a pas lieu en pr\u00e9sence de rhodium.

d) Catalyse par le cuivre, l'argent et l'or

Etant donné que les catalyseurs à base de rhodium se sont révélés des catalyseurs énantiosélectifs inefficaces nous avons décidé de tester d'autres métaux pour cette réaction : le cuivre, l'argent et l'or.

Malgré le fait que le cuivre ne soit pas un métal très actif pour cette transformation, comme nous l'avons vu lors du criblage des métaux, les catalyseurs à base de cuivre peuvent fournir des résultats intéressants pour ce type de transformation, surtout en termes d'énantiosélection¹⁰⁴. De plus, suite à une collaboration avec l'équipe du Pr. P.G. Cozzi de l'Université de Bologne, nous disposons de nombreux ligands chiraux susceptibles de complexer ce métal.

Les réactions ont été conduites dans les mêmes conditions, la seule différence étant le fait que la charge catalytique a été augmentée de 2% à 5% mole/mole, à cause de la moindre activité du cuivre.

Nous avons utilisé la même réaction en tant que réaction test, catalysée par 5% (mol/mol) de cuivre et utilisant 3 équivalents d'eau comme réactif dans le dichloroéthane comme solvant. La préparation du catalyseur se fait selon le protocole décrit par G. Fu, en mélangeant 5% de sel de cuivre avec 9,5% de ligand chiral et 10% d'eau. On ne connaît pas pour l'instant le rôle que l'eau joue dans ce processus de génération du catalyseur. G. Fu en faisant des essais d'insertion de carbénoïde dans la liaison OH des alcools a montré qu'en générant le catalyseur sans eau on peut faire chuter les excès énantiomériques de 86% à 22%.

La seule hypothèse que l'on peut émettre mais pour laquelle nous n'avons pas de preuve expérimentale est que, dans le cas du cuivre (II) l'eau va se coordiner sur les deux sites octaédriques de l'atome de cuivre afin de contrôler la stoechiométrie pour générer un complexe bis-aquo de type $\text{CuL}_2(\text{H}_2\text{O})_2$. L'eau, ligand labile, va ensuite se décomplexer lors de la génération du carbénoïde.

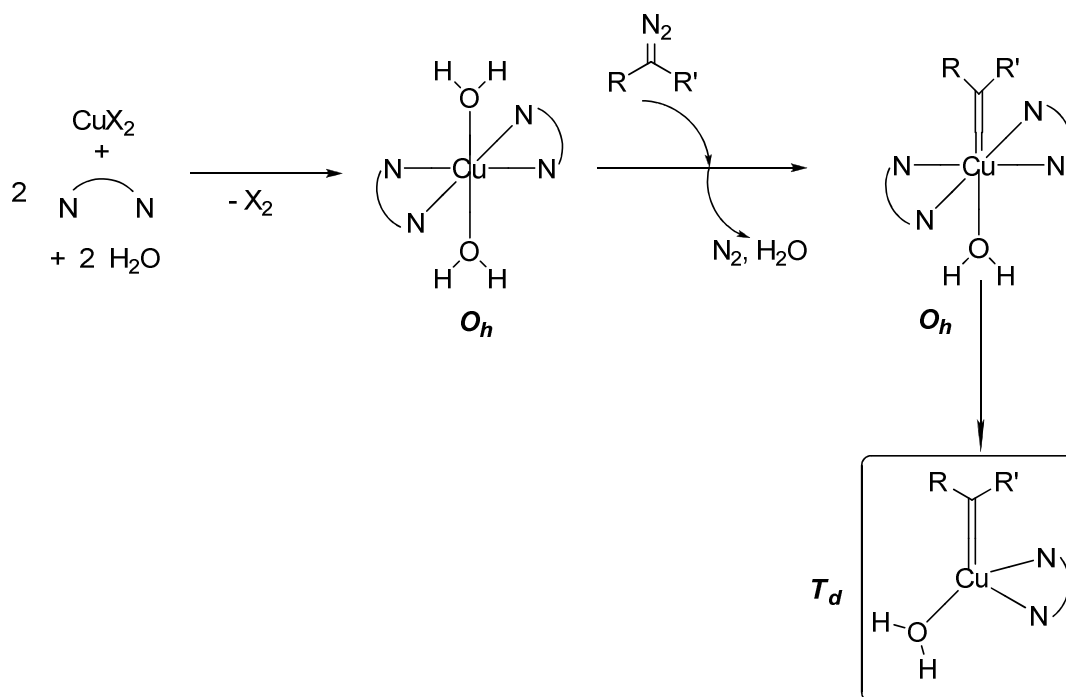


Schéma 51. Structure hypothétique de l'espèce catalytique

Il paraît que l'espèce active qui catalyse la réaction d'insertion est à base de cuivre (I) et les composés diazo ont la capacité de réduire le cuivre (II) pour former du cuivre (I)¹¹⁴. Mais si le composé diazo est capable de réduire le cuivre (II) pour former du cuivre (I) le nouveau complexe va adopter une géométrie tétraédrique, et cela va probablement s'accompagner, de la perte d'un ligand bidenté azoté (schéma 51). La nouvelle espèce aura en tant que « ligands » les trois éléments nécessaires pour réaliser l'insertion du carbénoïde dans la liaison OH : le « carbène », la molécule d'eau et une molécule de ligand chiral.

Dans cette étude de criblage, nous avons choisi huit sels de cuivre (I) et de cuivre (II), ainsi que cinq sels d'argent et un sel d'or. En ce qui concerne les ligands chiraux, nous avons testé une librairie de 60 de ligands chiraux, une partie d'entre eux étant disponibles commercialement, l'autre partie étant généreusement mise à notre disposition par l'équipe du Professeur Pier Giorgio Cozzi de l'Université de Bologne. La grande majorité de ces ligands sont des très bons complexants du cuivre. Selon la théorie HSAB¹¹⁵, le cuivre (I) est un métal mou et le cuivre (II) un métal « intermédiaire », d'où leur préférence pour des ligands mous et intermédiaire respectivement. Les ligands azotés sont, pour cette raison, des ligands de choix pour ce métal.

¹¹⁴ G. Wittig, K. Schwarzenbach, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **1961**, 650, 1.

¹¹⁵ R.G. Pearson, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 3533

Les types de ligands utilisés ont des structures des plus variées (schéma 55): pyridine-bis(oxazoline) (**L1-3** et **L29**), bis(oxazoline) (**L4-6**, **L7-8**, **L9** et **L11**, **L47**), semicorrines (**L12-13**), mixtes phosphine-oxazoline (**L15-19**), pyrrole-bis(oxazoline) (**L21-24**, **L27**), indole-oxazoline (**L25-26**, **L37**, **L38**, **L39**, **L44**), ferrocényl-oxazoline (**L30**), (benzo)thiophényl-oxazoline (**L31**, **L33**, **L34**, **L36**, **L42**), bases de Schiff (**L28**, **L35**), pyrrole-oxazoline (**L41**, **L43**) et autres types de structure.

L'ensemble des combinaisons soit 14 métaux x 60 ligands (840 expériences) a été mené en plaque 96 puits (environ 10 plaques) puis criblé, après une étape de dilution, à l'aide du test immunologique.

Présentation des résultats.

Pour des raisons de clarté nous avons opté pour une présentation graphique des résultats plutôt qu'une présentation sous forme de tableau, afin d'avoir une meilleure vue d'ensemble de ceux-ci et pour faciliter la compréhension des différentes tendances observées (figure 29).

Les résultats sont présentés en utilisant un code de couleurs. Ainsi chaque carré correspond à une expérience. Chaque carré est partagé en deux parties selon une de ses diagonales. La partie inférieure gauche représente le rendement de la réaction, selon une échelle des gris tandis que la partie supérieure droite du carré représente l'excès énantiomérique obtenu et est présenté en utilisant l'échelle des bleus dans le cas où l'énantiomère *S* est majoritaire et l'échelle des rouges dans le cas où l'énantiomère *R* est majoritaire. Etant donné le fait que le test immunologique que nous avons développé n'est pas un outil qui prétend pouvoir quantifier les valeurs du rendement et de l'excès énantiomérique avec une très grande précision, pour chaque moitié du carré seulement trois nuances de couleur sont utilisés, le blanc représentant une valeur comprise entre 0 et 25%. Le premier degré correspond à une valeur entre 26 et 50%, le deuxième entre 51 et 75% et le troisième une valeur comprise entre 76 et 100%.

Les structures des ligands utilisés ainsi que les résultats du criblage des catalyseurs à base de cuivre, argent et or sont présentés dans le schéma 53 et la figure 29 respectivement.

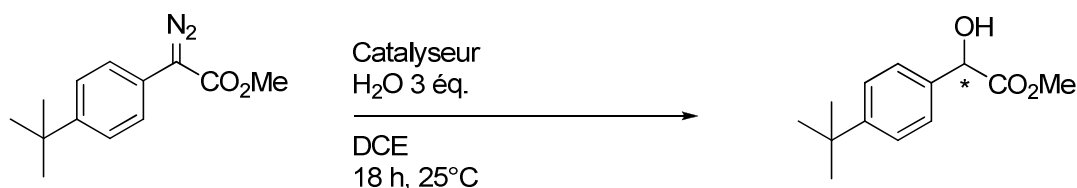


Schéma 52. Réaction test pour les essais d'insertion en présence de catalyseurs de rhodium. *Conditions* : Catalyseur préformé : métal 0,125 μmol , ligand 0,2375 μmol , eau 0,25 μmol , 30 min est additionné sur le composé diazo 2,5 μmol et H_2O 7,5 μmol , volume total DCE 150 μL ; 25°C, 18h.

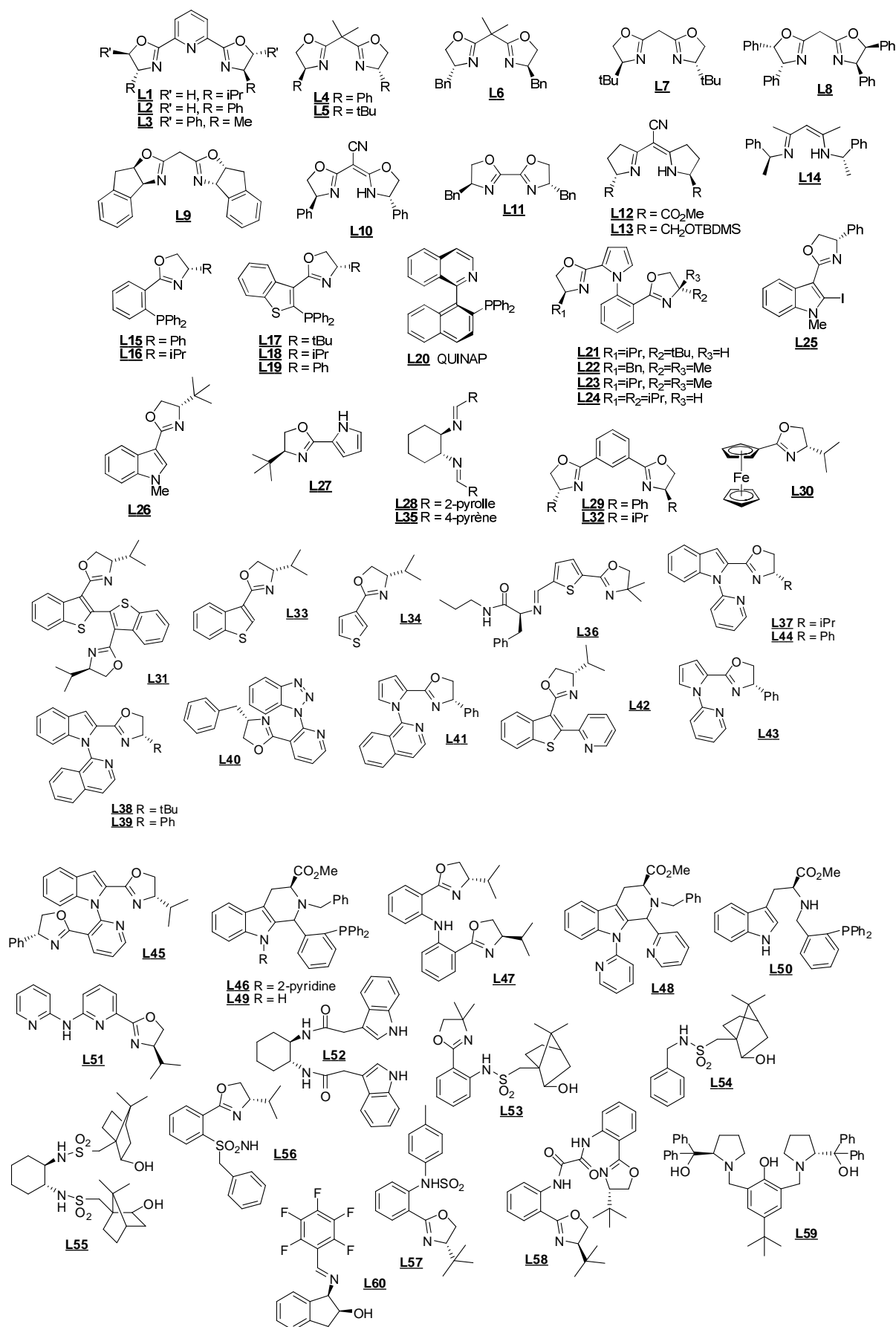


Schéma 53. Structure des ligands ayant été utilisés dans le criblage de catalyseurs à base de cuivre, d'argent et d'or pour la réaction d'insertion des carbénoïdes dans la liaison OH de l'eau

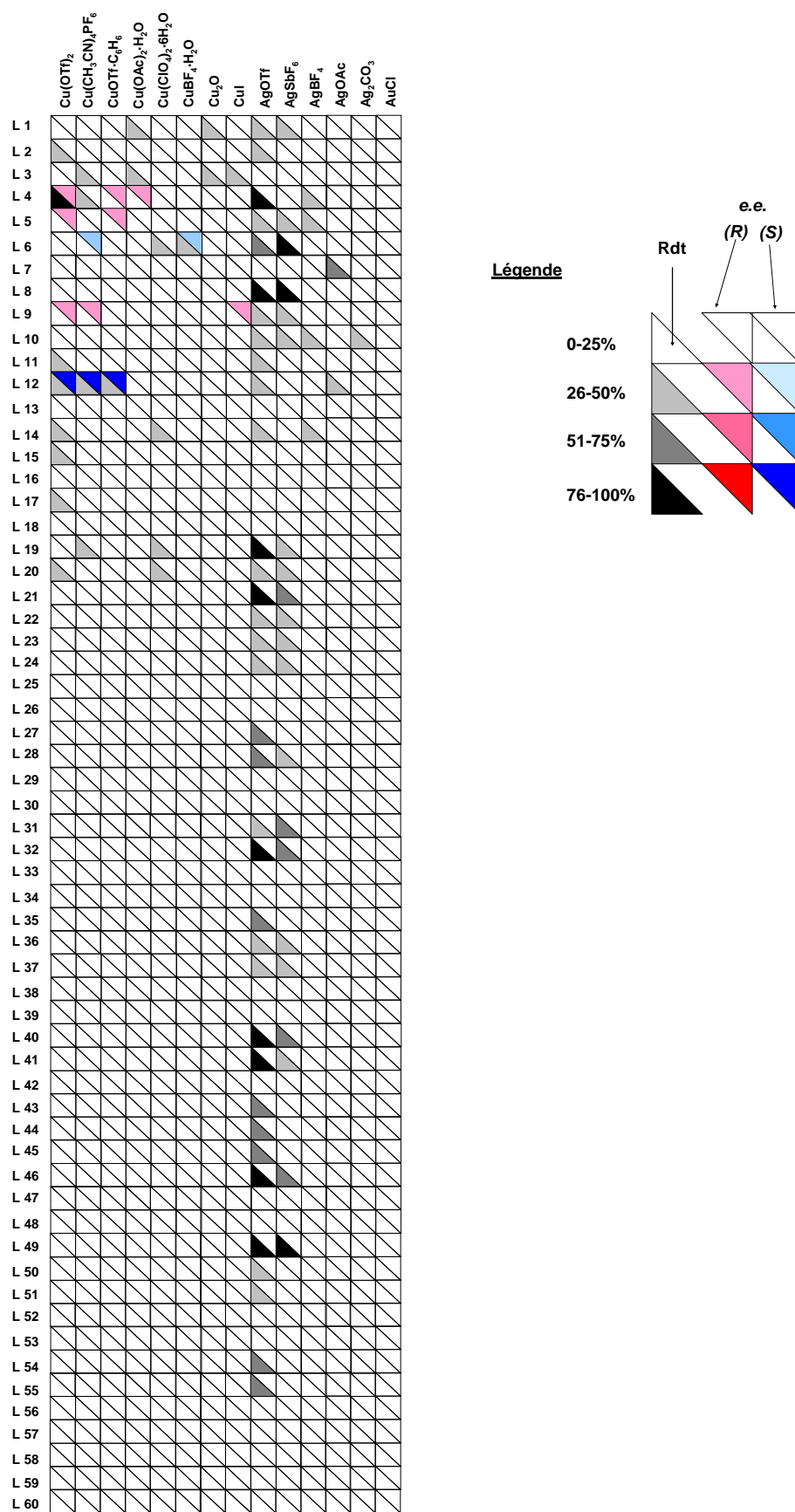


Figure 29. Criblage des catalyseurs à base de cuivre, argent et or pour la réaction d'insertion

Comme mentionné précédemment, plus de 800 de systèmes catalytiques ont été testés pour cette réaction, mais seulement quelques combinaisons sont intéressantes. Il est à remarquer que parmi les 60 ligands utilisés très peu semblent activer le cuivre pour cette réaction. En ce qui concerne le rendement, le meilleur système est obtenu en utilisant la combinaison cuivre (II) triflate avec le ligand **L4** (bis(oxazoline) R = phényle) qui fournit un rendement de 80%. Tous les autres systèmes fournissent des rendements inférieurs à 50% ce qui prouve que le cuivre reste un métal relativement peu actif pour cette transformation.

De façon générale les seuls résultats remarquables en terme d'énantiosélectivité sont obtenus en présence de quelques ligands : les bis(oxazolines) **L4**, **L5**, **L6** et **L9** et la semicorrine **L12** (on ne peut pas proposer de corrélation structurale pour ces résultats, ce type d'exercice étant probablement trop risqué).

En terme d'énantiosélectivité le meilleur résultat correspond à la combinaison ligand **L12** avec le cuivre (II) triflate (rendement 34%, *ee* 78% (*S*)), le cuivre (I) (tetrakis-acétonitrile)hexafluorophosphate (rendement 26%, *ee* 78%) et le cuivre (I) triflate (complexe de benzène) qui fournit un rendement de 32% avec un excès énantiomérique de 84% en faveur de l'énantiomère (*S*) de l' α -hydroxyester.

Ce dernier résultat a été confirmé par analyse par CLHP chirale.

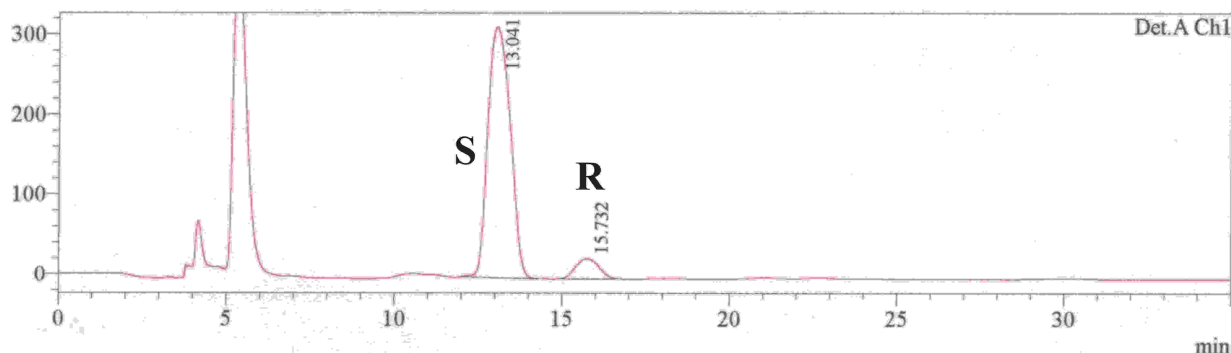


Figure 30. Analyse par CLHP chirale de l'échantillon d' α -hydroxyester énantiomériquement enrichi, issu de la catalyse par le cuivre et le ligand **L12**. Conditions : colonne Chiralcel OD, éluant hexane/éthanol 99/1 à 1 mL/min, détection UV à 220 nm.

Le criblage des métaux effectué initialement a montré que les sels d'argent étaient capables de catalyser cette transformation avec des rendements intéressants. Nous avons criblé cinq sels d'argent, l'argent ayant prouvé une certaine capacité d'énantiosélection pour la réaction d'insertion des carbénoïdes dans des liaisons NH¹¹⁶.

¹¹⁶ S. Bachmann, D. Fielenbach, K.A. Jørgensen, *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, 2, 3044.

Comme on a pu le voir dans la présentation des résultats, nous avons retrouvé ici une situation partiellement similaire à la celle rencontrée dans le cas du rhodium. Plusieurs catalyseurs à base d'argent réalisent cette transformation avec d'excellents rendements, mais par contre dans aucun cas nous n'obtenons de produits énantioenrichis. Ceci est dû probablement au fait que, dans le cas de la catalyse à l'argent, contrairement à la catalyse au cuivre le mécanisme n'est pas un transfert de carbène mais plutôt une catalyse de type acide de Lewis¹¹⁶, comme proposé dans le schéma 54.

Selon le mécanisme proposé, le transfert de chiralité se fait lors de l'étape de protonation de la forme énolique du substrat complexé par le catalyseur chiral, ce qui rend le processus d'énantiosélection peu efficace.

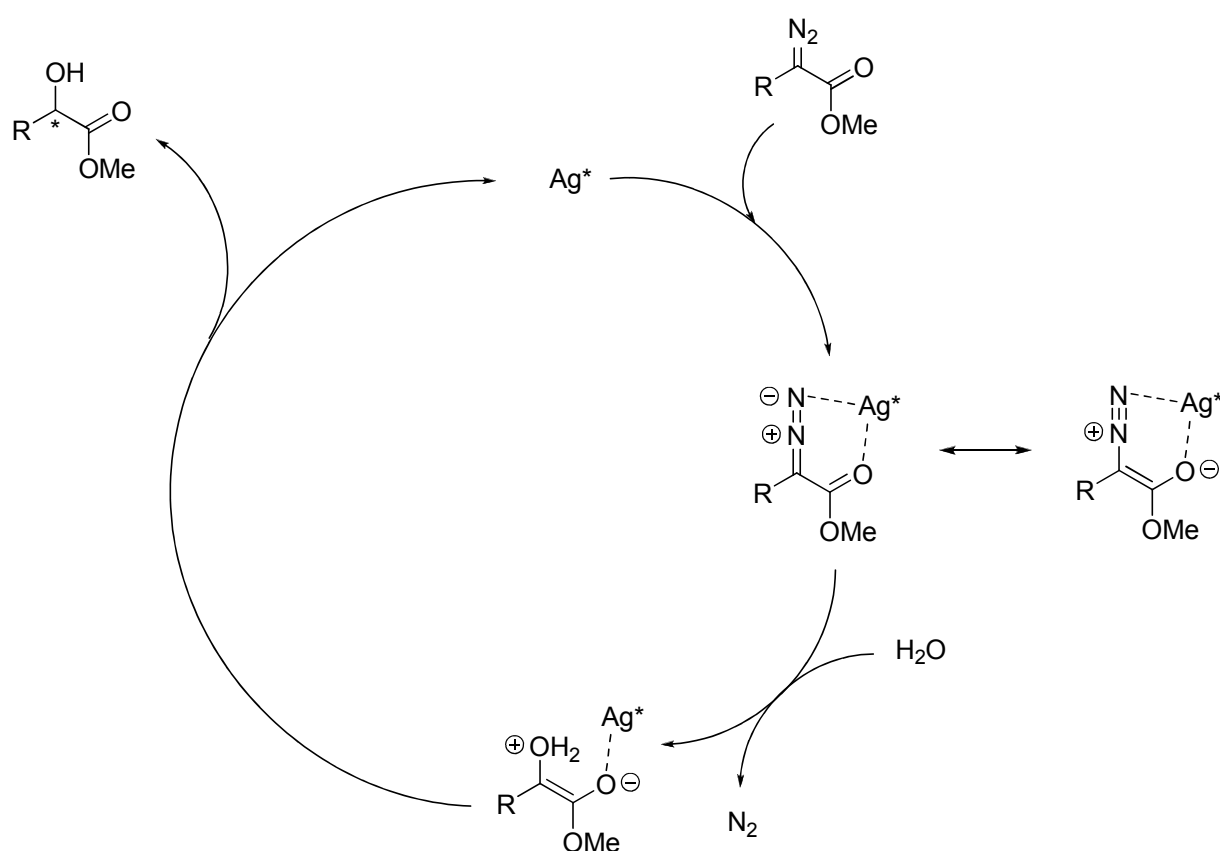
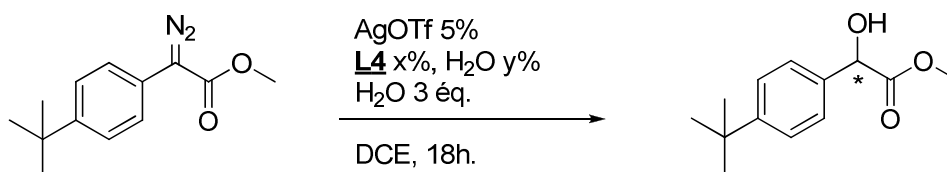


Schéma 54. Proposition de mécanisme pour la réaction d'insertion catalysée par l'argent

La chimie de coordination de l'argent étant différente de celle du cuivre nous avons mené une étude afin de déterminer quel rapport stoechiométrique entre les composants du catalyseur serait souhaitable pour obtenir de meilleurs résultats pour la réaction d'insertion. Nous avons varié les rapports entre la quantité de ligand et la quantité d'eau utilisée pour générer le catalyseur ce qui a conduit aux résultats présentés dans le tableau 5. Ces travaux ont été conduits

avec la combinaison AgOTf/**L4** qui lors du criblage s'est révélée efficace en terme de rendement.



Entrée	Rapport Ag/ L4 /H ₂ O	ee (%)
1	1/1/1	0
2	1/0,5/1	0
3	1/1/0	10
4	1/0,5/0	0
5	1/2/2	0

Tableau 5. Influence de la stœchiométrie métal-ligand pour la réaction d'insertion

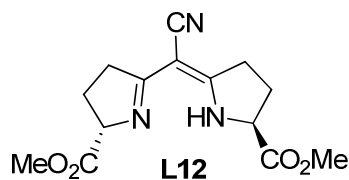
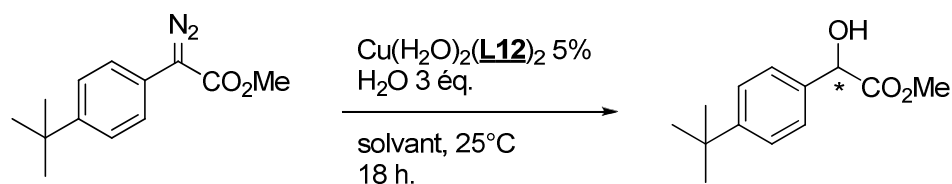
On observe ici que dans le cas de la réaction catalysée par un mélange Ag/**L4**/H₂O de 1/1/0 le produit d'insertion est obtenu avec un excès énantiomérique de 10% en faveur de l'énantiomère *S* ce qui est, à notre connaissance, le premier cas d'insertion énantiosélective dans une liaison OH à l'aide d'un catalyseur asymétrique à base d'argent. Ce résultat montre également que les conditions de formation des complexes d'argent utilisées lors du criblage n'étaient pas optimales puisque apparemment la présence de l'eau lors de la formation du catalyseur entraîne une chute de l'*ee*. Cependant compte tenu de la faible valeur de *ee* obtenue lors de cette étude nous n'avons pas jugé utile de faire à nouveau un criblage de complexes d'argent formés en absence de l'eau.

Dans le cas des catalyseurs à base d'or les résultats prouvent que ce métal ou en tout cas les combinaisons AuCl•**L1-60** ne soient indiquées pour catalyser cette réaction. Les rendements et les excès mesurés sont très faibles. Etant données les similarités entre l'or et l'argent, dans ce cas aussi il est probable qu'un mécanisme de catalyse de type acide de Lewis a lieu.

Nous avons alors décidé d'essayer d'optimiser les conditions réactionnelles pour le meilleur système détecté afin d'améliorer les énantiosélectivités et surtout les rendements qui sont relativement faibles.

III.3.4. Tentatives d'optimisation des meilleurs systèmes

Dans un premier temps nous avons effectué une étude de solvant pour pouvoir observer leur influence sur les résultats de la réaction. Sept solvants différents ont été utilisés et nous avons observé que le solvant jouait effectivement un rôle très important pour la réaction.



Entrée	Solvant	Rendement (%)	e.e. (%)
1	Dichlorométhane	32	72
2	Dichloroéthane	34	74
3	Dioxane	4	4
4	Acétonitrile	4	13
5	Toluène	6	45
6	THF	11	0
7	DMF	40	0

Tableau 6. Influence du solvant. Quantification du rendement de de l'*ee* par CLHP

Cette étude confirme les données de la littérature stipulant que pour ce genre de réaction les meilleurs solvants sont les solvants halogénés. Effectivement, les deux solvants halogénés testés produisent des résultats comparables (32% vs 34% pour le rendement et 72% vs 74% pour l'excès énantiomérique). Les autres solvants testés font chuter les rendements et les excès énantiomériques. Seule la diméthylformamide augmente légèrement rendement mais, dans ce cas un produit racémique est obtenu.

La structure de type semicorrine s'est montrée comme étant un bon ligand du cuivre pour cette réaction, alors nous avons décidé d'effectuer le criblage de plusieurs catalyseurs générés à l'aide de ligands de ce type, qui nous ont été fournis par le Professeur P.-G. Cozzi. Les résultats et les structures des ligands sont présentées dans la figure 31.

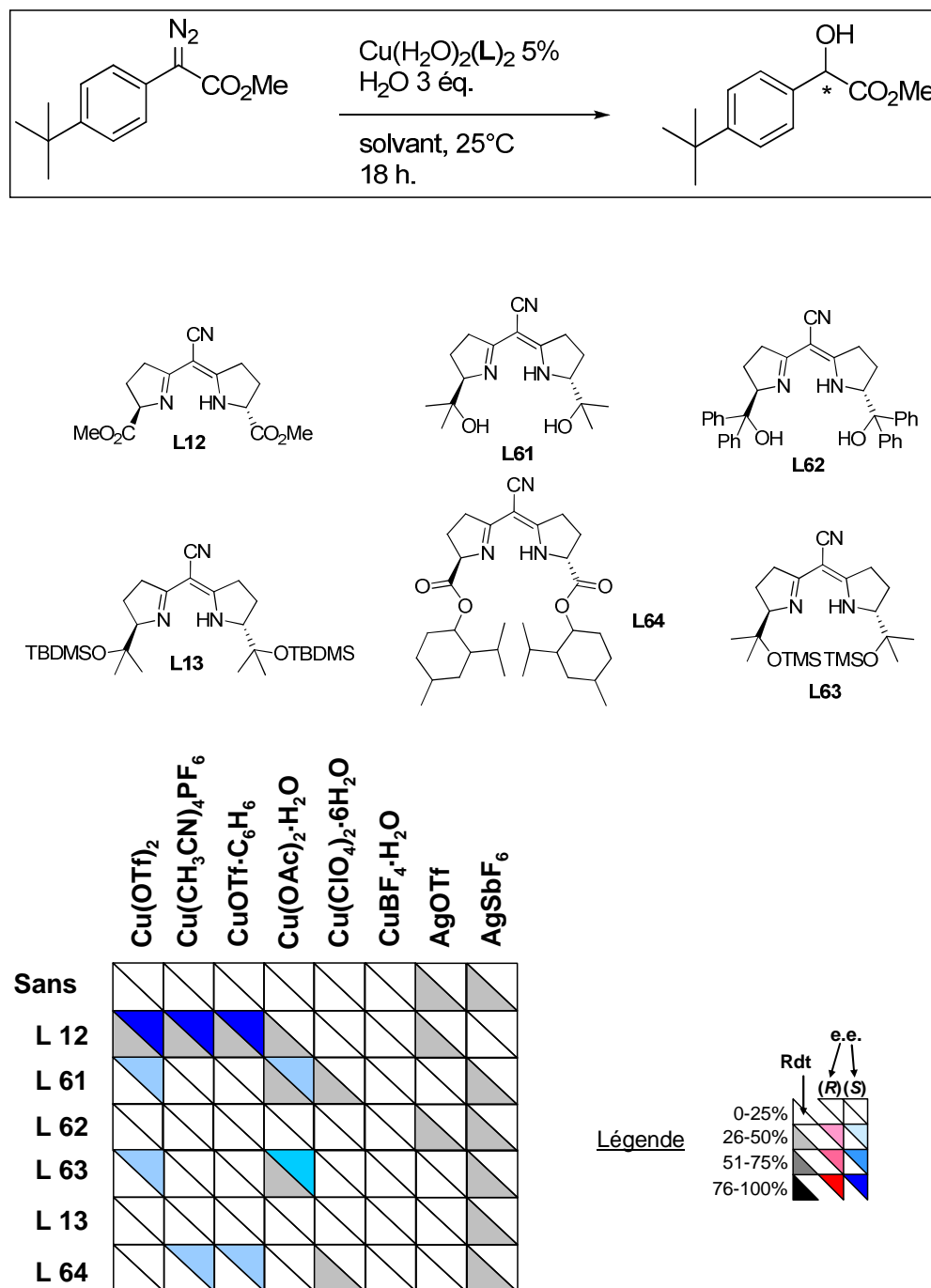


Figure 31. Résultats obtenus pour le criblage des catalyseurs à base de ligand de type semicorrine

Ces ligands ont tous un squelette commun mais diffèrent par les groupements connectés au niveau des carbones asymétriques. Ainsi on distingue les ligands semicorrine ayant des

fonctions esters, comme les ligands **L12** et **L64**, des fonctions alcools (**L61** et **L62**) et, finalement, les alcools protégés comme les ligands **L63** et **L13**.

Comme on peut le constater, le meilleur système reste toujours le système catalytique généré par les trois premières espèces de cuivre avec le ligand semicorrine méthyl ester. Malgré leurs structures variées, les autres semicorrines testées n'ont pas amélioré ni le rendement, ni l'énantiosélection de cette réaction.

Un autre paramètre que nous avons voulu étudier est le pH de l'eau utilisée pour la réaction d'insertion, les résultats obtenus au cours de cette étude sont reportés dans le tableau suivant.

Entrée	pH de l'eau	Rendement (%)	ee (%)
1	1	24	71
2	2	32	77
3	3	29	77
4	4	33	75
5	5	34	70
6	6	35	71
7	7	34	73
8	8	34	71
9	9	38	78
10	10	37	71

Tableau 7. Influence du pH de l'eau sur le rendement/ee de la réaction d'insertion. Quantification du rendement et de l'ee par CLHP

On peut observer que le pH de l'eau qui est utilisée en tant que réactif a relativement peu d'influence sur le rendement et l'excès énantiomérique. On observe une légère amélioration du rendement quand le pH de l'eau augmente, mais cette augmentation n'est pas significative. Les valeurs d'excès énantiomériques sont relativement stables quel que soit le pH de l'eau utilisée.

Nous avons alors voulu voir s'il n'était pas possible d'augmenter le rendement de la réaction en augmentant la quantité d'eau utilisée. La réaction effectuée en présence d'un grand excès d'eau (~1700 équivalents) n'a pas conduit au résultat attendu, le rendement obtenu étant de l'ordre de 10%. De même, la réaction effectuée dans des systèmes ternaires monophasiques

dichloroéthane/acétone/eau ou dichloroéthane/acétonitrile/eau a conduit à des résultats décevants, seulement des traces de produit étant détectées dans le mélange réactionnel.

Une catalyse de transfert de phase a été alors conduite et en tant qu'agent de transfert de phase nous avons utilisé le chlorure de tetrabutylammonium. Dans ce cas le produit d'insertion de l'eau n'a pas été détecté. La réaction effectuée en conditions biphasiques (50% eau, 50% dichloroéthane) en présence du sodium dodécyl sulfate (0,2 éq.) en tant qu'agent de transfert de phase n'a fournit que 6% de rendement et l'*ee* a chuté à 22%.

Suite à ces tentatives infructueuses, nous avons pensé à augmenter la concentration d'eau dans le milieu réactionnel en utilisant une source homogène d'eau dans le dichlorométhane de manière à nous affranchir de l'emploi d'agents de transfert de phase ou de systèmes de solvant ternaire qui peuvent perturber le système catalytique. Notre choix de source homogène d'eau s'est plus particulièrement porté sur les hydrates de cétones.

Certaines fonctions carbonyles présentant des groupements fortement électroattracteurs en position α sont, en présence d'eau, en équilibre avec la forme hydrate. L'ajout de ces composés sur des espèces métal carbénoïdes peut conduire aux composés souhaités selon deux voies possibles : soit l'hydrate joue le rôle de source d'eau homogène soit c'est lui qui réagit en formant transitoirement un hémiacétal (schéma 55).

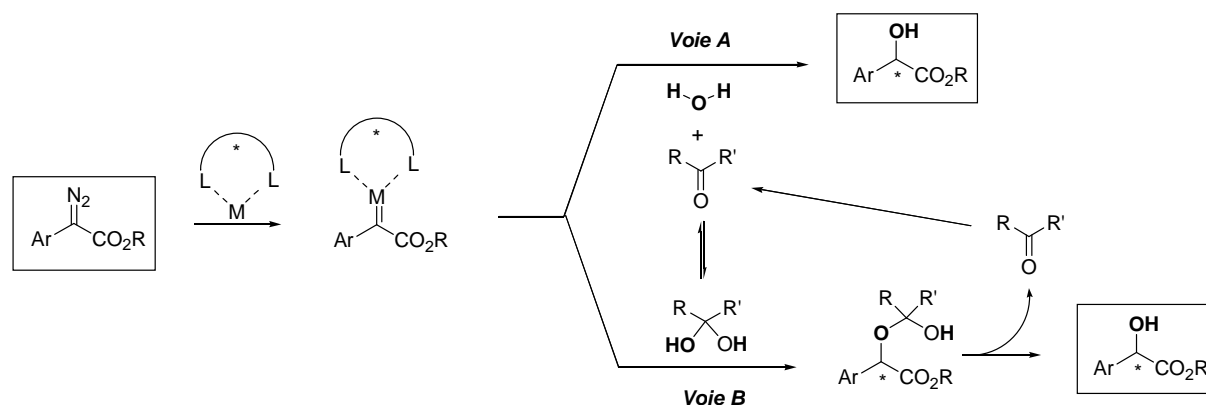


Schéma 55. Réactions possibles en présence d'hydrates.

Notre choix de composés hydratés s'est porté sur les composés carbonylés possédant un groupement CF_3 en position α , une série de 15 hydrates a été choisie (schéma 56).

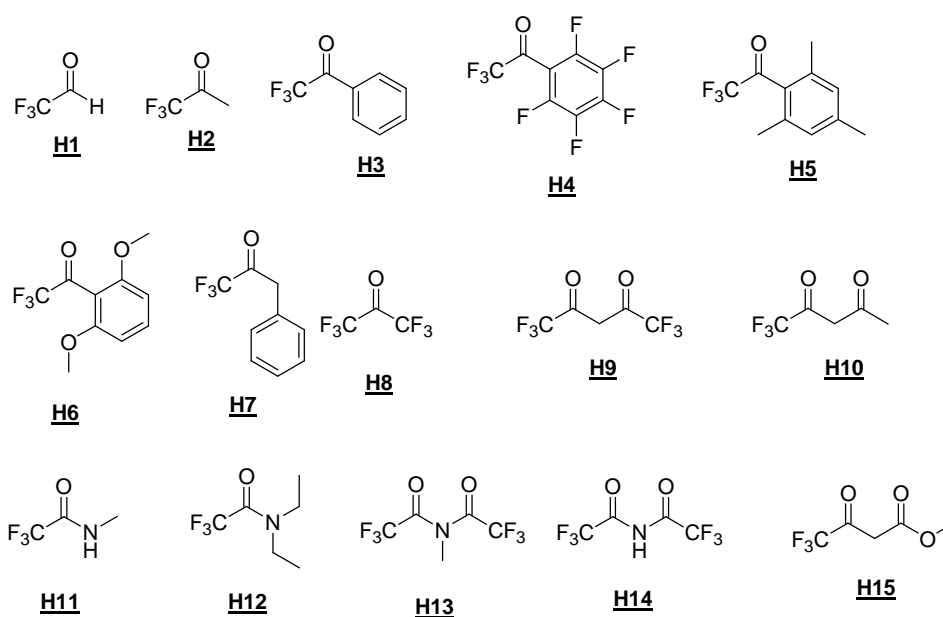


Schéma 56. Structure des composés α -trifluorocarbonyles utilisés dans cette étude

Nous avons souhaité tester cette idée sur plusieurs systèmes catalytiques. Bien sûr nous avons effectué ces expériences sur les meilleurs systèmes mis au jour lors du criblage précédent tels que ceux obtenus en présence de $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ et du ligand semicorrine **L12** ou encore avec les ligands bis(oxazolines) (box) **L4** et **L5**. Nous avons complété cette étude avec des ligands pyridine-bis(oxazoline) (pybox) **L1**, **L2** et **L3**. Les catalyseurs ont été générés in situ en mélangeant le cuivre (II) triflate (5% mol/mol) avec le ligand correspondant (9,5% mol/mol) et de l'eau (10% mol/mol) suivie d'une agitation pendant 30 minutes avant d'ajouter le substrat et le mélange eau hydrate. Nous avons également voulu étudier l'influence de la présence des hydrates sur les complexes chiraux du rhodium qui avaient donné des résultats décevants dans les études précédentes. L'ensemble des résultats obtenus est résumé dans la figure suivante.

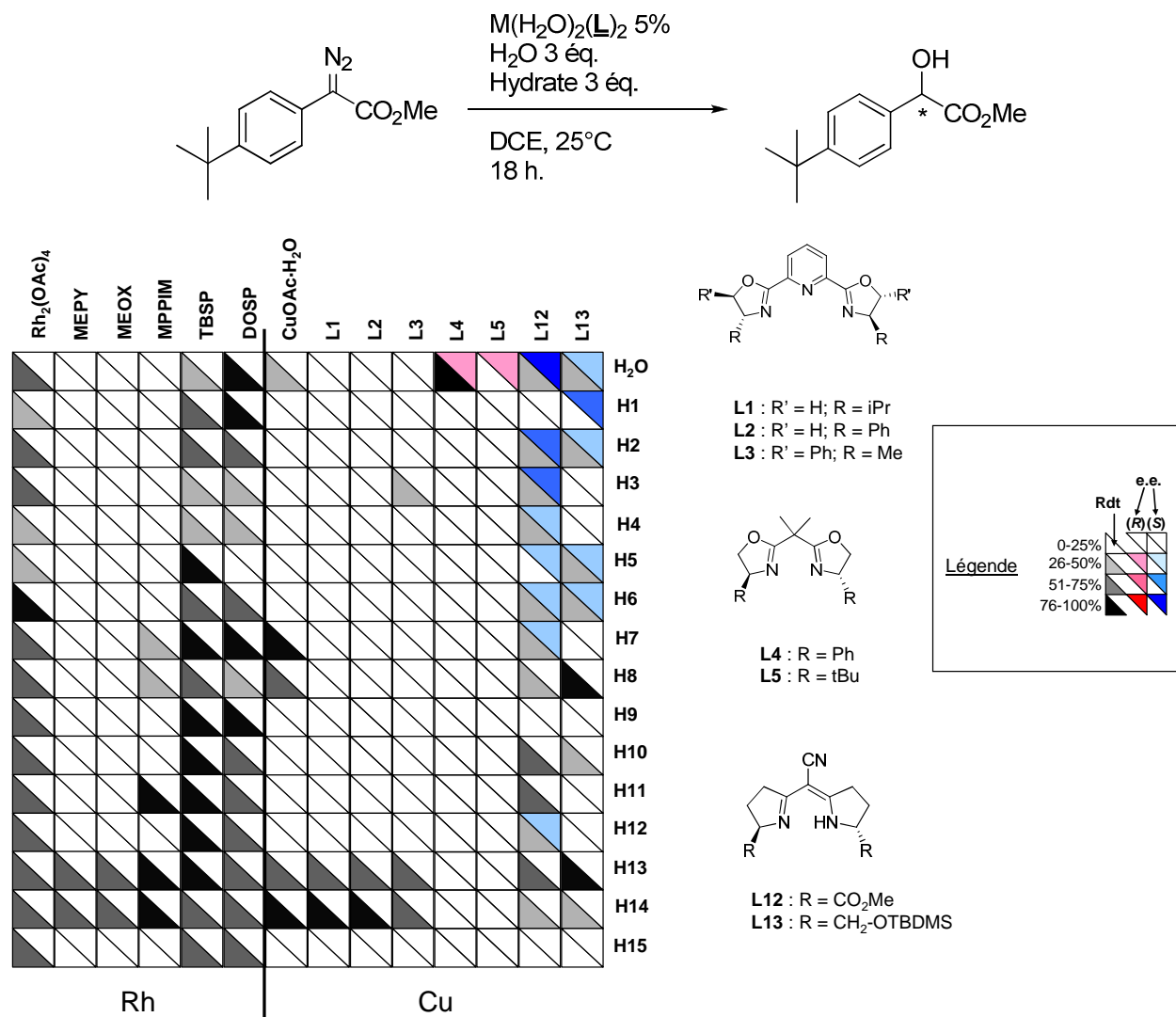


Figure 32. Influence de la présence d'hydrate sur la réaction.

On peut observer, ici, dans le cas de la catalyse au rhodium que, encore une fois, celle-ci à conduit à des produits racémiques. Dans le cas de la catalyse par le rhodium tétraacétate on peut observer un effet bénéfique du composé **H6** qui fait progresser le rendement de 65 à 80%. De même, les complexes de rhodium portant les ligands carboxylate TBSP et DOSP donnent des résultats intéressants en présence de plusieurs hydrates. On peut aussi observer que les hydrates **H13** et **H14** semblent favoriser la réaction d'insertion, ces hydrates conduisant à des rendements supérieurs à 80% dans le cas de l'utilisation de tous les catalyseurs à base de rhodium.

Dans le cas de la catalyse au cuivre, on peut retrouver dans certains cas la même influence des composés **H13** et **H14**. Pour les ligands de structure bis(oxazoline) et pyridine-bis(oxazoline) utilisées dans cette étude, l'utilisation des hydrates s'est avérée peu bénéfique. Seulement dans le cas de l'emploi des semicorines **L12** et **L13** on peut observer la formation du

produit d'insertion énantioenrichi mais, malheureusement, dans ces cas, la présence des hydrates n'améliore pas les résultats. On peut toutefois remarquer que la présence de l'hydrate **H1** combiné avec le système catalytique $\text{Cu}(\text{OTf})_2/\mathbf{L13}$ permet une augmentation de l'excès énantiomérique de 38% à 52% (*S*).

Pour finir, nous avons confirmé, sur 25 échantillons, les résultats du criblage effectués par le test immunoenzymatique en confrontant les valeurs de rendements et d'excès énantiomériques avec celles obtenues par CLHP.

De bonnes corrélations ont été obtenues, comme on peut voir dans la figure suivante.

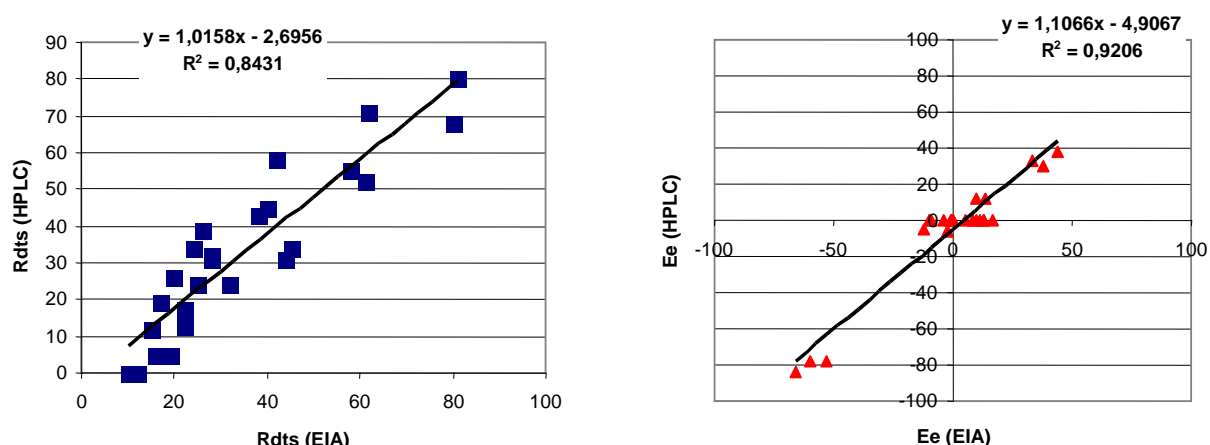
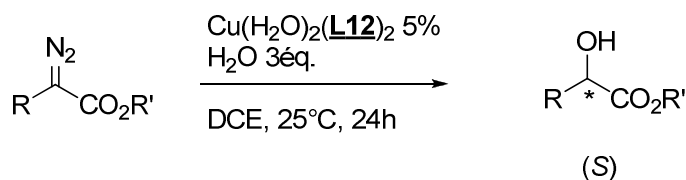


Figure 33. Corrélation CLHP/Test immunoenzymatique (EIA) pour la mesure du rendement et des excès énantiomériques.

III.3.5. Généralité du catalyseur

Le meilleur système catalytique étant, parmi tous ceux testés, le complexe de cuivre du ligand **L12**, nous avons ensuite souhaité mesurer les performances de ce système pour d'autres substrats que celui utilisé pour le criblage. Le tableau 8 montre les résultats obtenus en présence de trois autres composés diazo de la même famille. Ces expériences ont été réalisées à l'échelle du millimole.



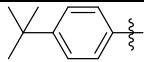
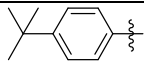

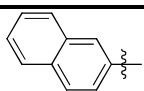
Entrée	R	R'	Rendement (%)	ee (S) (%)
1		Me	42	85
2		<i>t</i> Bu	35	73
3		Me	36	72
4		Me	28	72

Tableau 8. Généralité du catalyseur

On peut observer ici, encore une fois, que les meilleurs résultats sont toujours obtenus avec le substrat de référence.

En variant le cycle aromatique ni les rendements ni les excès énantiomériques ne sont améliorées. Le changement de la nature de l'ester n'améliore malheureusement pas non plus les résultats, dans le cas de l'ester *tert*-butylique le résultat étant de 35% pour le rendement et de 73% pour l'*ee*.

III.4. Deuxième réaction cible : Réduction énantiosélective des cétoacides

Une autre voie d'accès aux α -hydroxyesters énantiomériquement enrichis est la réduction catalytique énantiosélective des α -cétoesters correspondants.

Dans la littérature existe un nombre relativement important de publications décrivant ce genre de transformation catalytique, que ce soit en mode homogène¹¹⁷ ou hétérogène¹¹⁸.

¹¹⁷ a) J.W. Yang, B. List, *Org. Lett.* **2006**, 8, 5653; b) C.-J. Wang, X. Sun, X. Zhang, *Synlett* **2006**, 1169; c) Y. Sun, X. Wan, J. Wang, Q. Meng, H. Zhang, L. Jiang, Z. Zhang, *Org. Lett.* **2005**, 7, 5425; d) W. Tang, X. Zhang, *Chem. Rev.* **2003**, 103, 3029; e) M.D. Jones, R. Raja, J.M. Thomas, B.F.G. Johnson, D.W. Lewis, J. Rouzaud, K.D.M. Harris, *Angew. Chem. Intl. Ed. Engl.* **2003**, 42, 4326; f) T. Benincori, E. Cesarotti, O. Piccolo, F. Sanniccolo, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 2043; g) H.-U. Blaser, H.-P. Jalett, F. Spindler, *J. Mol. Catal. A: Chem.*, **1996**, 107, 85; h) P.

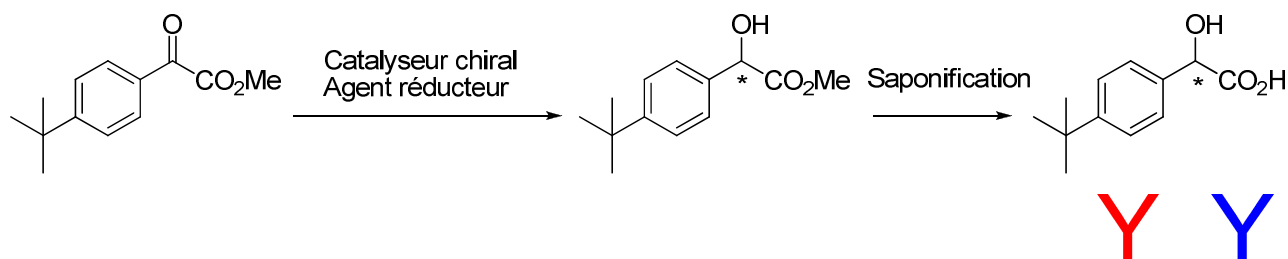


Schéma 57. Obtention des α-hydroxyacides optiquement actifs par réduction énantiosélective des α-cétocétates suivie de saponification

Parmi les procédures décrites, notre attention s'est focalisée sur un système biomimétique décrit notamment par B. List.¹¹⁹ Ce système utilise un complexe obtenu avec un ligand bisoxazoline (ligand **L6** de notre banque) et le cuivre triflate jouant le rôle d'acide de Lewis chiral en présence d'une dihydropyridine (analogue du NADPH) comme agent réducteur. Ce système permet d'obtenir des α-hydroxy-esters avec de bons rendements et excès énantiomériques (schéma 58).

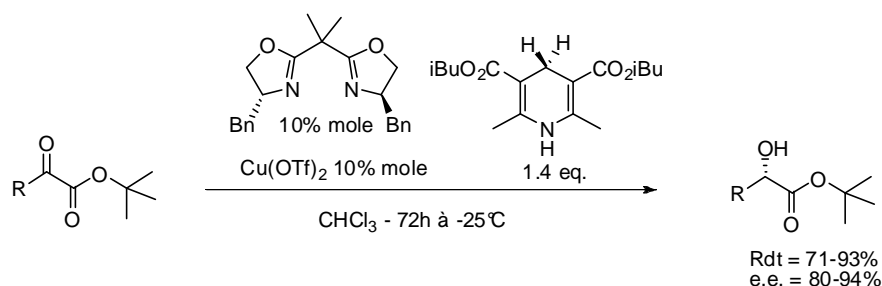


Schéma 58. Système catalytique utilisé par B. List.

Il nous a semblé intéressant d'appliquer les conditions décrites par cette équipe aux différents systèmes organométalliques que nous pouvons générer grâce à notre banque de ligands et notamment de comparer les résultats obtenus avec ceux recueillis lors du criblage précédent.

Gamez, F. Fache, M. Lemaire, *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, 6, 705; i) K. Mashima, K.-h. Kusano, N. Sato, Y.-i. Matsumura, K. Nozaki, H. Kumobayashi, N. Sayo, Y. Hori, T. Ishizaki, S. Akutagawa, H. Takaya, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 3064.

¹¹⁸ a) X. Zuo, H. Liu, D. Guo, X. Yang, *Tetrahedron* **1999**, 55, 7787; b) H.-U. Blaser, H.-P. Jalett, M. Müller, M. Studer, *Catal. Today* **1997**, 37, 441; c) A. Baiker, *J. Mol. Catal. A: Chem.* **1997**, 115, 473.

¹¹⁹ J. W. Yang, B. List; *Org. Lett.* **2006**, 24, 5653.

Les paragraphes suivants résument les résultats préliminaires que nous avons débuté à la fin de ce travail de thèse.

III.4.1 Synthèse du substrat et de l'agent réducteur

Deux voies de synthèse du produit de départ α -cétoester ont été suivies : soit par oxydation des α -hydroxyesters correspondants à l'aide de l'oxyde de manganèse (IV) soit par traitement à l'Oxone® du précurseur diazo¹²⁰ dont la synthèse a été présentée précédemment.

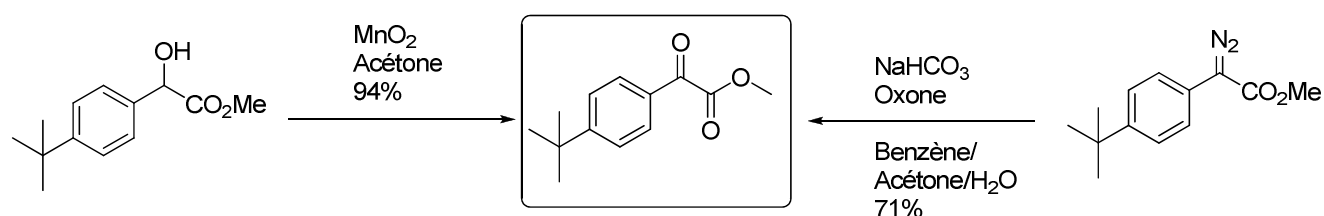


Schéma 59. Voies de synthèse choisies pour accéder à l' α -cétoester modèle.

En tant qu'agent réducteur nous avons préféré utiliser la dihydropyridine ayant des esters diisobutyle. La synthèse de ce composé (DHP) est effectuée avec un rendement modeste de 25%, selon un procédé décrit¹²¹.

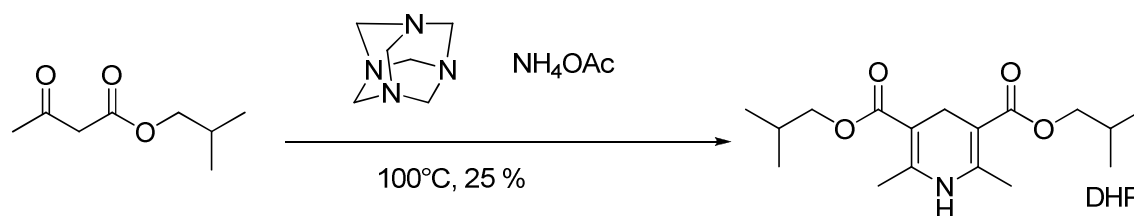


Schéma 60. Synthèse de l'agent réducteur

¹²⁰ M.Ma, C. Li, L. Peng, F. Xie, X. Zhang, J. Wang, *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 3927.

¹²¹ S. Torchy, G. Cordonnier, D. Barbry, J.J. Vanden Eynde, *Molecules* **2002**, 7, 528.

III.4.2. Criblage de catalyseurs pour la réaction énantiosélective de réduction des cétoesters

La réaction test utilisée pour le criblage a été la réduction énantiosélective du 2-(4-*tert*-butylphényl)-2-oxoacétate de méthyle pour fournir le produit de réduction correspondant, le 2-(4-*tert*-butylphényl)-2-hydroxyacétate de méthyle, optiquement enrichi. Une saponification subséquente en présence d'hydroxyde de sodium ou de lithium permet d'accéder à l' α -hydroxyacide correspondant sans racémisation¹²².

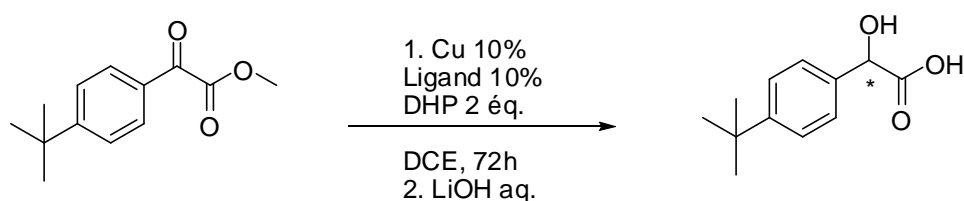


Schéma 61. Réaction test pour le criblage des catalyseurs pour la réaction de réduction énantiosélective.

Conditions : catalyseur préformé : métal 10%, ligand 10% dans 20 μ L DCE, 30 min, puis cétoester 10 μ mol, dihydropyridine 14 μ mol, 25°C, 72 h.

Les catalyseurs sont générés in situ, pendant 30 min. puis le substrat et l'agent réducteur sont additionnés. Le solvant choisi pour cette réaction est le dichloroéthane car il permet une bonne solubilisation de la dihydropyridine.

Les ligands chiraux utilisés pour générer les catalyseurs font partie de la banque de ligands utilisée pour la réaction d'insertion et leurs structures sont présentées dans le schéma suivant.

¹²² a) U. Felfer, U.T. Strauss, W. Kroutil, W.M.F. Fabian, K. Faber, *J. Mol. Catal. B* **2001**, 15, 213; b) Y. Sun, X. Wang, J. Wang, Q. Meng, H. Zhang, L. Jiang, Z. Zhang, *Org. Lett.* **2005**, 7, 5425.

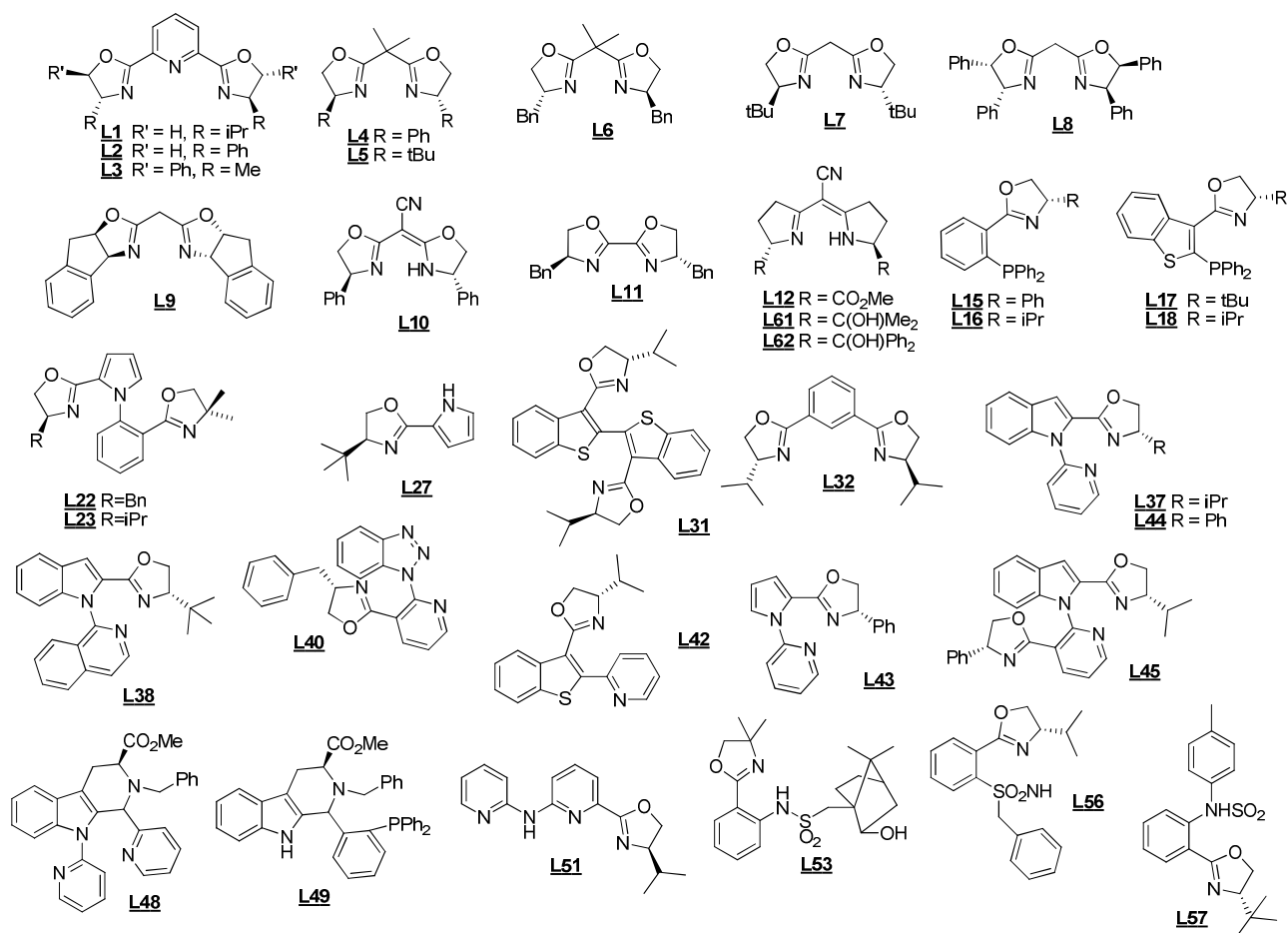


Schéma 62. Ligands utilisés pour le criblage de catalyseurs à base de cuivre pour la réaction de réduction

Six sels de cuivre ont été testés en présence de ces 36 ligands chiraux (un total de 214 expériences) pour conduire aux résultats suivants :

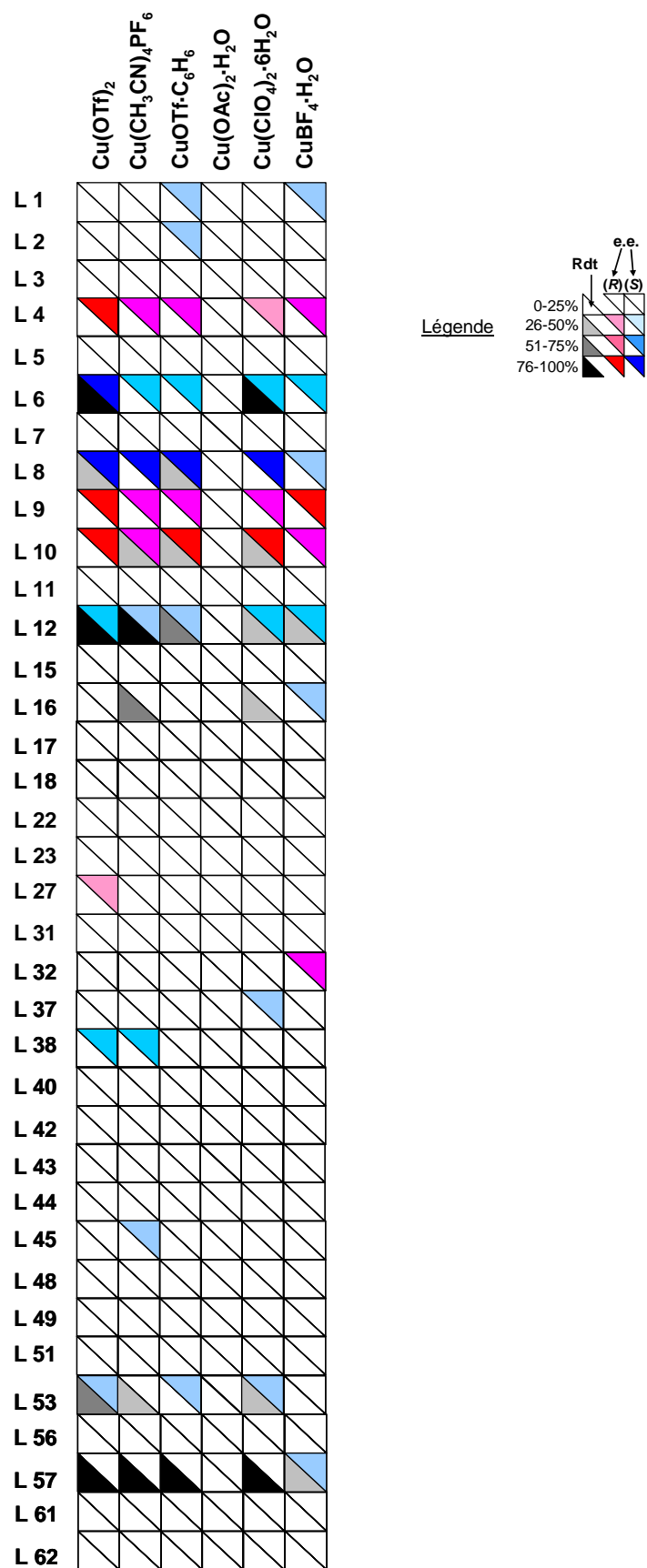


Figure 34. Résultats du criblage des catalyseurs pour la réaction de réduction asymétrique

Dans le cas de cette réaction les inductions asymétriques sont plus importantes par rapport à la réaction d'insertion et beaucoup plus de catalyseurs se montrent actifs chimiquement et/ou énantiosélectifs.

Ainsi, parmi les systèmes fournissant l'énantiomère (*S*) avec un bon excès on peut citer le ligand **L8** (bis(oxazoline)), qui en combinaison avec le triflate de cuivre (II) fournit 93% d'excès, mais un rendement faible de 37%. Le système décrit par B. List, qui utilise le ligand **L6**, conduit lui aussi à des bons résultats le rendement étant supérieur à 90% et l'*ee* de 80%.

En ce qui concerne l'énantiomère (*R*), trois ligands fournissent des résultats remarquables, les ligands **L4**, **L9** et **L10**. Le ligand **L4** (bis(oxazoline)), en présence de cuivre (II) triflate fournit un rendement faible de 13% mais un *ee* de 82%, pour le ligand **L9** (bis(oxazoline)), le catalyseur généré en présence de cuivre (II) triflate fournit 83% d'excès et le complexe généré en présence de cuivre (I) tétrafluoroborate hydrate, 78% d'excès. Les rendements restent par contre faibles, seulement 25% dans le premier cas. Le ligand **L10** (bis(oxazoline)), en combinaison avec le cuivre (II) triflate, le cuivre (I) triflate et le cuivre (II) perchlorate fournit des excès de 80, 77 et 80% respectivement. Cependant, les rendements ne dépassent pas les 40%.

Deux autres ligands ont attiré notre attention : le ligand **L57** (sulfonamide-oxazoline) s'est révélé très efficace en terme de conversion chimique, ses combinaisons avec les sels de cuivre (à l'exception de l'acétate de cuivre (II) et du tétrafluoroborate) fournissant le produit attendu avec des rendements supérieurs à 80% ; malheureusement dans tous les cas les énantiosélectivités sont très faibles, inférieures à 20%.

L'autre ligand d'intérêt est le ligand **L12**, la semicorrine qui s'est révélée efficace pour la réaction d'insertion et qui, dans le cas de la réaction de réduction fournit des rendements très honorables et des excès modestes en faveur de l'énantiomère (*S*). Ainsi, en combinaison avec le cuivre (II) triflate le rendement est de 77% et l'*ee* de 51%, avec le Cu(CH₃CN)PF₆ le rendement est quantitatif et l'*ee* de 47%, le complexe généré en présence de perchlorate de cuivre (II) fournit un excès de 59% mais le rendement chute à 40% tandis que le complexe obtenu en présence de tétrafluoroborate de cuivre (I) conduit à un rendement de 32% pour un excès de 52%.

Après que ce travail ait été achevé, un article¹²³ est apparu dans la littérature, publié par une équipe de l'Université de Nankai en Chine. Ce travail décrit l'emploi d'un nouveau ligand du cuivre pour la réaction d'insertion énantiosélective des carbénoïdes dans la liaison OH de l'eau. Le système décrit dans cette étude est comparable au nôtre en terme d'énantiosélectivité,

¹²³ S.-F. Zhu, C. Chen, Y. Cai, Q.-L. Zhou, *Angew. Chem. Intl. Ed. Engl.* **2008**, 47, 932.

en revanche il est supérieur en ce qui concerne les rendements. Les meilleurs résultats obtenus par l'équipe chinoise sont présentés dans le schéma suivant.

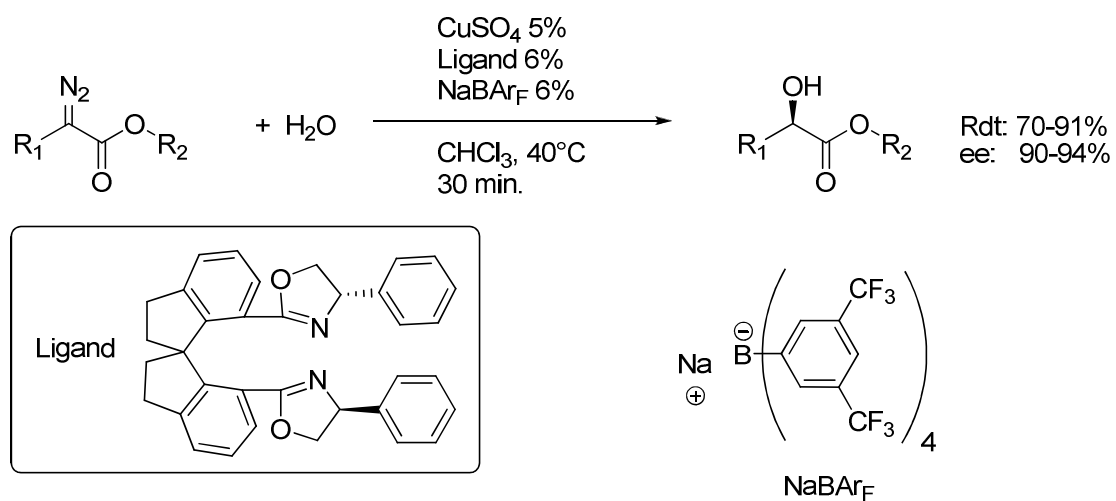


Schéma 63. Insertion énantiosélective des carbénoïdes dans la liaison OH de l'eau et structure du ligand asymétrique proposé par Q.-L. Zhou

IV. Conclusion

Les criblages effectués pour les réactions présentées dans les sous chapitres antérieurs nous ont permis de découvrir quelques systèmes catalytiques ayant des propriétés intéressantes pour les deux réactions ciblées (schéma 64).

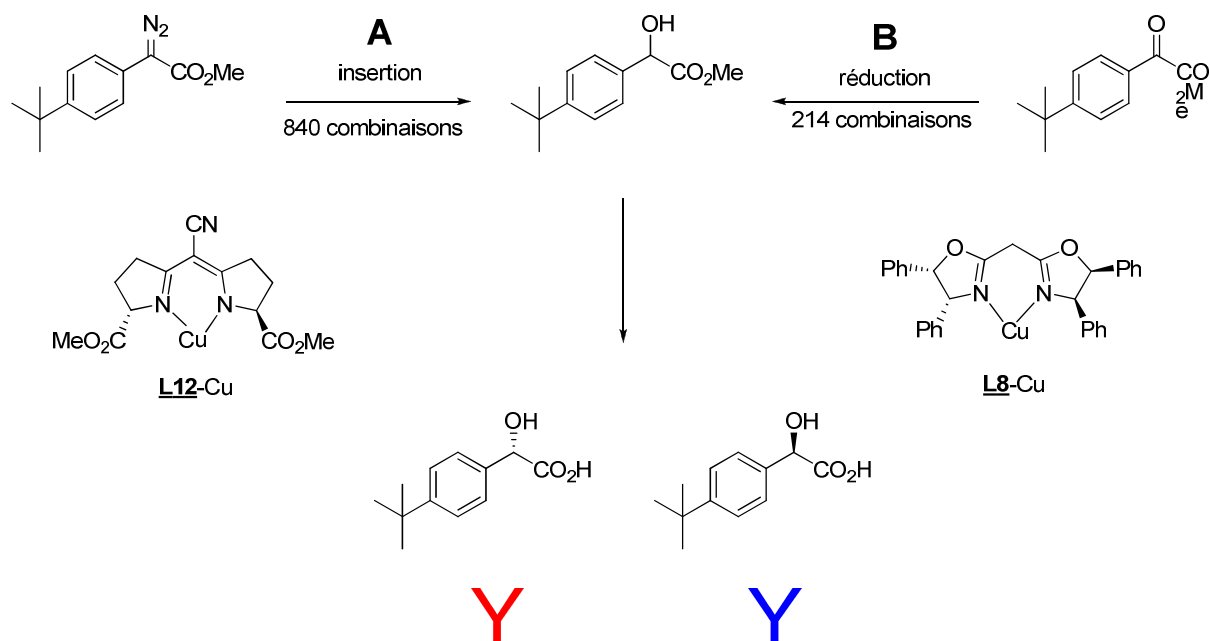


Schéma 64. Réactions cible pour le criblage à haut débit de catalyseurs

Pour la première transformation, nous avons démontré que grâce à ce type de criblage nous avons été capables de découvrir un système catalytique nouveau, fournissant des excès énantiomériques bien supérieurs à ceux décrits par G. Fu. Cette réaction a un intérêt synthétique certain car elle permet d'utiliser l'eau comme réactif en synthèse, réactif peu onéreux, non polluant et extrêmement efficace en terme d'« économie d'atomes ». Le système catalytique utilisé est lui à base de cuivre, ce qui représente un autre avantage, ce métal étant peu onéreux par rapport à ses voisins du tableau périodique capables de catalyser cette réaction. De même, un système catalytique à base de ruthénium découvert grâce à ce criblage permet de réaliser cette transformation avec un rendement quasi quantitatif à des charges catalytiques comprises entre 0,5 et 1%.

Pour la deuxième réaction cible, nous n'avons, malheureusement, pas réussi à trouver des systèmes réellement meilleurs que ceux décrits dans la littérature, cette réaction très connue étant déjà bien documentée. Nous pouvons toutefois mentionner que le complexe au cuivre obtenu avec le ligand **L8** est supérieur aux systèmes décrits en terme d'énantiosélectivité. Les résultats

préliminaires obtenus sur le substrat α -cétoester modèle devront toutefois être confirmés lors d'études complémentaires. Le criblage des catalyseurs a conduit par contre à une découverte surprenante : le système catalytique cuivre semicorrine fournissant les meilleurs résultats pour la réaction d'insertion s'est montré aussi actif pour cette transformation fournissant des excellents rendements et un excès énantiomérique de ~60%.

Une perspective possible de ce travail consisterait à réaliser une catalyse tandem énantiosélective.

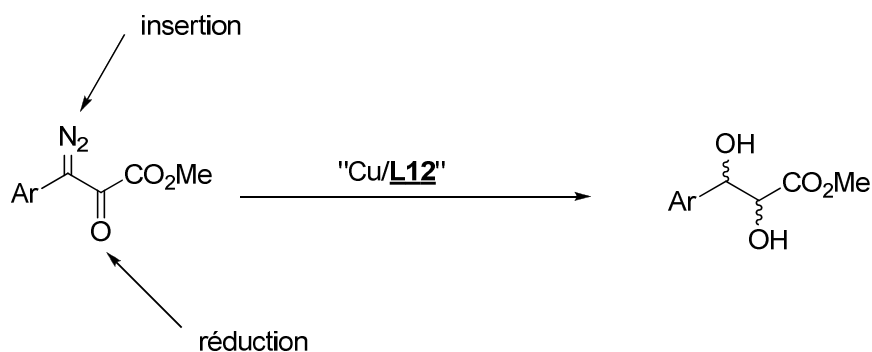


Schéma 65. Catalyse asymétrique tandem

Chapitre 3. Criblage de réactions énantiosélectives à l'aide d'anticorps polyclonaux énantiosélectifs.

Les résultats décrits dans le chapitre précédent montrent l'utilité du test basé sur l'emploi d'anticorps monoclonaux énantiosélectifs pour le criblage de réactions asymétriques générant des α -hydroxy-acides. Les principaux avantages de cette méthode résident essentiellement dans sa rapidité et fiabilité pour mettre en lumière les meilleurs catalyseurs au sein d'une banque. En revanche, cette méthode n'est pas générale dans le sens où pour chaque réaction d'intérêt de nouveaux anticorps monoclonaux doivent être produits. Or, le processus qui mène à l'obtention d'anticorps monoclonaux est long et très onéreux. On peut estimer à plus de 6 mois le temps nécessaire pour obtenir des anticorps monoclonaux contre un haptène d'intérêt et ceci pour un coût de l'ordre de 50 k€.

Le processus qui a mené à l'obtention d'anticorps monoclonaux énantiosélectifs anti- α -hydroxy acides, utilisés lors des études précédentes, a consisté à injecter un haptène sous forme racémique et à isoler individuellement chaque anticorps monoclonal suite aux étapes longues et coûteuses de culture cellulaire (figure 35). De cette étude est ressortie la présence de deux populations d'anticorps monoclonaux : des anti-racémiques et des énantiosélectifs.

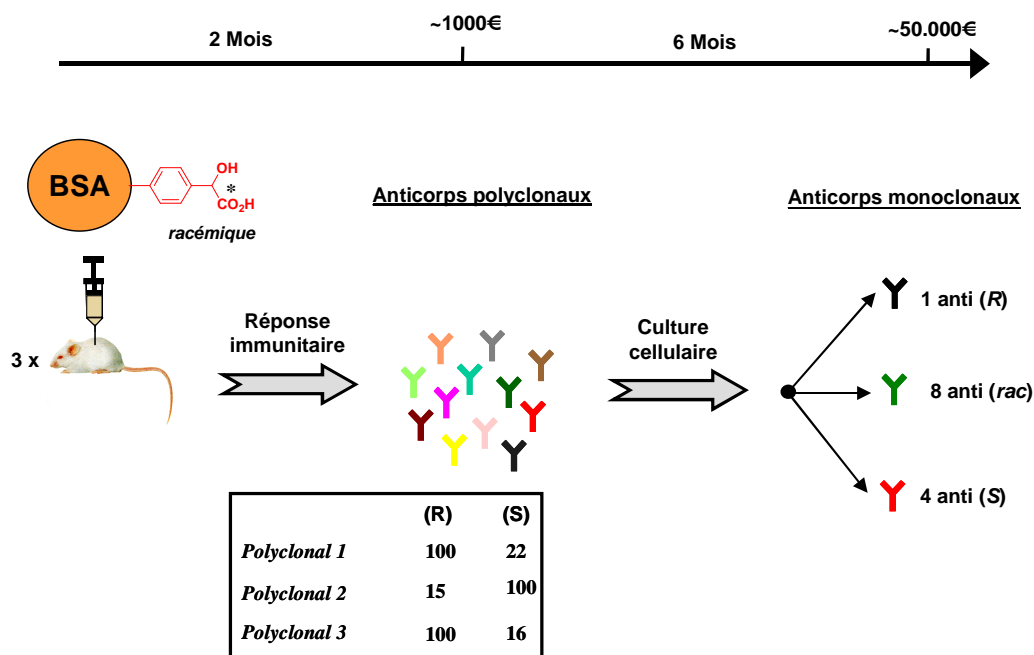


Figure 35. Étapes ayant conduit à l'obtention d'anticorps monoclonaux anti- α -hydroxy acides. Réactions croisées des polyclonaux pour chaque énantiomère de l'acide mandélique.

Ces deux populations d'anticorps se retrouvent présentes dans le sérum des animaux immunisés (3 souris) à des taux variables. Le sérum est en effet composé d'un mélange d'un très grand nombre d'anticorps différents ; suite à l'immunisation la concentration en anticorps spécifiques anti-haptène augmente, mais reste très faible par rapport à la concentration globale en anticorps. Dans le cas où l'haptène utilisé est un racémique deux produits différents sont présentés au système immunitaire et la réponse anticorps peut être différente pour chacun des deux énantiomères de l'haptène.

Un contrôle de l'énantiosélectivité de liaison vis-à-vis de l'acide mandélique des anticorps polyclonaux récoltés au cours du processus d'obtention d'anticorps monoclonaux anti- α -hydroxy acides montre une préférence à la liaison d'un énantiomère par rapport à l'autre (voir encadré dans la figure 35). Cette énantiosélectivité de liaison est significative et variable (préférence pour l'énantiomère (*R*) ou (*S*)) d'un anticorps polyclonal à l'autre.

Cette observation montre qu'il est possible de produire des anticorps polyclonaux (qui, rappelons le, sont composés de milliers d'anticorps différents) capables d'une énantiosélection de liaison. Ceci nous a incité à débiter une étude dont l'objectif principal est de démontrer la possibilité de produire des anticorps polyclonaux suffisamment énantio-discriminants pour être utilisés dans des tests de criblage tel que celui mis au point dans le chapitre précédent (figure 36). Si tel est le cas, le coût ainsi que le temps nécessaire à la mise en place d'un test immunoenzymatique appliqué au criblage de catalyseurs asymétriques s'en trouverait grandement diminué et deviendrait accessible à la plupart des laboratoires.

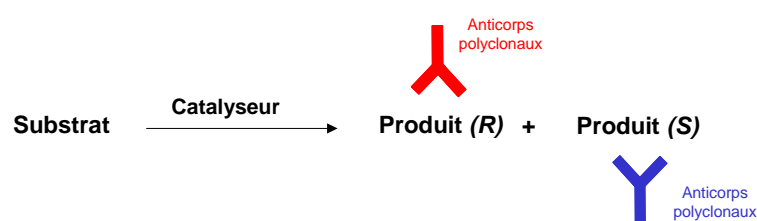


Figure 36. Principe d'un criblage de catalyseurs asymétriques à l'aide d'anticorps polyclonaux.

I. Obtention et caractérisation d'anticorps polyclonaux énantiosélectifs

Dans le but de maximiser les chances de succès nous avons opté pour une stratégie différente de celle suivie lors de la production d'anticorps monoclonaux énantiosélectifs et décidé d'injecter individuellement des immunogènes obtenus à partir d'haptènes énantiomériquement purs. Chaque énantiomère sera donc injecté à un ou des animaux différents avec l'espoir que cette immunisation engendre un taux d'anticorps circulants énantiospécifiques important.

Le choix de l'haptène s'est rapidement tourné vers la *N*-benzoyl-Lysine (*N*-Bz-Lys, schéma 66) pour les raisons suivantes : *i*) le groupement amine de la chaîne latérale permet un ancrage aisé de l'haptène sur la protéine porteuse, *ii*) les deux énantiomères de ce composé sont commercialement disponibles et *iii*) le groupement benzoyl assure une certaine immunogénicité (aptitude à déclencher une réponse immunitaire) du composé.

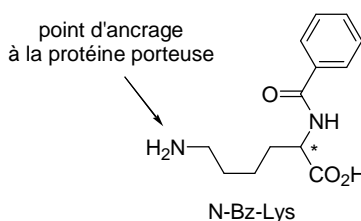


Schéma 66. Haptène choisi pour la production d'AcPs énantiosélectifs

Il est à noter que le point d'ancrage de l'haptène à la protéine porteuse a délibérément été choisi à l'opposé du centre stéréogène. De cette manière les anticorps anti-haptène devraient présenter une forte spécificité pour le centre chiral et une faible spécificité pour la chaîne latérale. Ce dernier point peut présenter un avantage important car de tels anticorps permettraient de quantifier la concentration de chaque énantiomère d'une variété d'acides aminés *N*-benzoylés et donc d'étudier l'efficacité de catalyseurs pour une variété de substrats. Outre la réduction de coût et de temps de mise au point, un test de criblage utilisant de tels anticorps polyclonaux aurait donc également l'avantage de permettre d'étudier la généralité d'un catalyseur.

I.1. Obtention d'anticorps polyclonaux anti-*N*-Benzoyl-Lysine énanti-sélectifs

I.1.1. Préparation des immunogènes et traceurs enzymatiques

Comme nous l'avons rappelé dans le chapitre 1, par définition un haptène ne peut induire de réponse immunitaire, il est nécessaire pour cela de le coupler de façon covalente à une protéine porteuse par exemple. L'entité obtenue, appelée immunogène est alors capable de déclencher la production d'anticorps suite à son injection. Cette réponse anticorps est multiple : il y a production d'anticorps anti-protéine et production d'anticorps anti-haptène. Ces derniers peuvent être sélectivement détectés par le biais d'un traceur enzymatique résultant de la conjugaison de l'haptène avec l'acétylcholine estérase (AChE), l'enzyme utilisée couramment au laboratoire.

La préparation des deux entités, à savoir l'immunogène et le traceur enzymatique, constitue donc la première étape du processus de production d'anticorps polyclonaux anti-haptène. Celle-ci utilise des méthodes classiques de bioconjugaison décrites dans la figure 37.

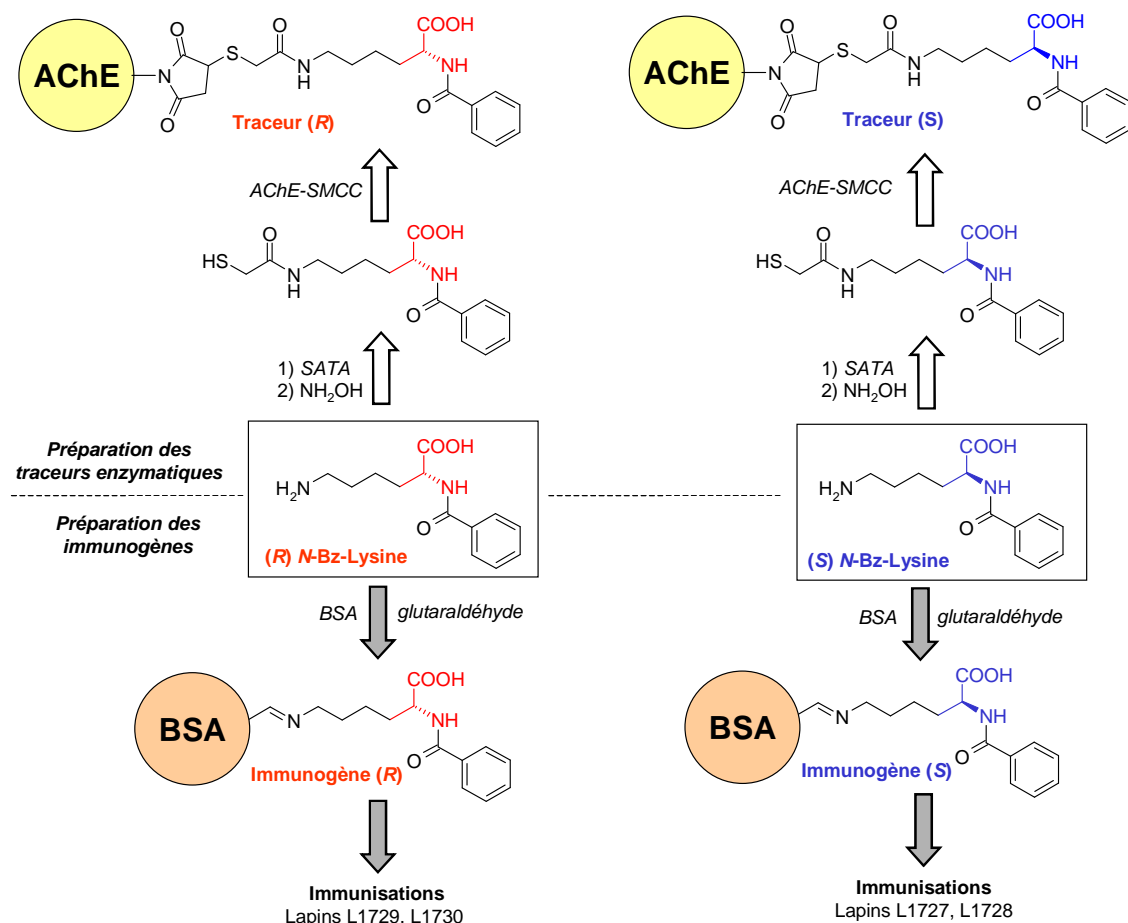


Figure 37. Préparation des immunogènes et des traceurs enzymatiques à partir de la *N*-Benzoyl-(*R*) ou (*S*)-Lysine. BSA = albumine bovine, AChE = acétylcholine estérase.

La préparation des immunogènes a eu lieu par couplage de la *N*-Benzoyl-(*R*) ou (*S*)-Lysine sur l'albumine bovine (BSA) à l'aide du glutaraldéhyde, un agent de couplage homobifonctionnel classiquement utilisé pour le couplage d'haptène possédant une fonction amine. Ce composé réagit avec les fonctions amines de l'haptène et celles de la protéine porteuse par formation de base de *Schiff*. Il est à noter que cet agent de couplage existe essentiellement sous forme de polymère résultant d'une autocondensation par réactions d'aldolisation/crotonisation (schéma 67). La mise en œuvre de ce couplage est très simple et efficace assurant l'ancrage d'un nombre important d'haptènes à la surface de la protéine.

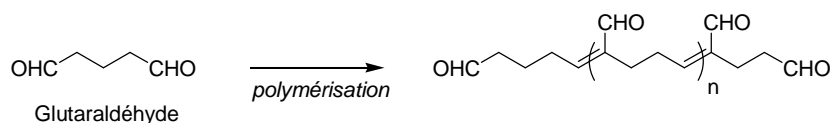


Schéma 67. Structure du glutaraldéhyde.

La préparation des traceurs enzymatiques nécessite un procédé permettant de contrôler au mieux le nombre d'haptène ancré à la surface de l'enzyme, le nombre optimal étant de un haptène par enzyme. C'est pourquoi le procédé utilisant le glutaraldéhyde ne peut être appliqué dans le cas de la préparation des traceurs. Celle-ci s'est opérée dans un processus en deux temps. Dans une première étape un groupement thiol protégé sous forme d'acétate est introduit dans la structure de la *N*-Bz-Lysine grâce à l'emploi de l'agent de couplage hétérobifonctionnel nommé SATA (schéma 68). Ce dernier possède un groupement ester activé permettant la formation d'un lien peptidique avec la fonction amine de la *N*-Bz-Lysine.

De façon parallèle, un groupement maléimide est introduit à la surface de l'enzyme (AChE) via la formation d'un lien peptidique avec les résidus aminés de l'enzyme et l'agent hétérobifonctionnel SMCC (schéma 68).

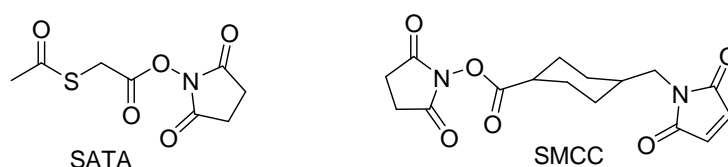


Schéma 68. Structures du SATA (acide S-acétyl thioglycolique) et SMCC

L'hydrolyse du thioester du dérivé *N*-Bz-Lysine-SATA est alors effectuée par addition d'hydroxylamine conduisant aux dérivés de Lysine comportant une fonction thiol. Ces derniers sont alors mis à réagir avec le dérivé AChE-SMCC. Après réaction à température ambiante pendant une heure, les conjugués sont alors purifiés sur colonne d'exclusion stérique. Ce type de préparation de traceurs est couramment pratiqué au laboratoire.¹²⁴

I.1.2. Suivi de la réponse immunitaire

Chaque immunogène a été injecté à deux lapins par voie sous-cutanée. Suite à cette première injection, 4 rappels d'injection ont été réalisés par intervalle de 2 mois (figure 38). Une semaine après chaque injection, un échantillon sanguin est récolté pour chaque animal.

¹²⁴ a) D. Caruelle, J. Grassi, J. Courty, B. Groux-Muscattelli, P. Pradelles, D. Barritault, J.P. Caruelle, *Anal. Biochem.* **1988**, 173, 328; b) P. Pradelles, C. Antoine, J.P. Lelouch, J. Maclouf, *Methods in Enzymol.* **1990**, 187, 82; c) J. Grassi, Y. Frobert, P. Pradelles, F. Chercuite, D. Gruaz, J.M. Dayer, P.E. Poubelle, *J. Immunol. Methods* **1989**, 123, 193 ; d) L. Duhau, J. Grassi, D. Grouselle, A. Enjalbert, J.M. Grognet, *J. Immunoassay* **1990**, 12, 233.

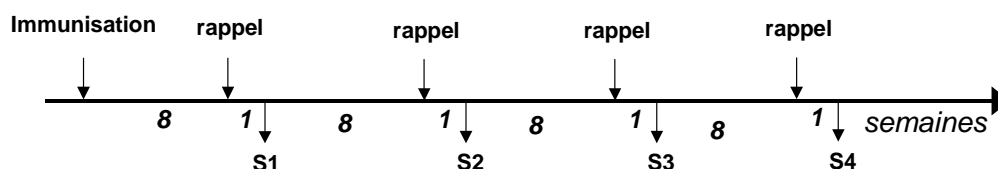


Figure 38. Protocole d'immunisation et de récolte des sérums.

Le suivi de la réponse immunitaire a été réalisé par test ELISA, grâce à l'utilisation des traceurs enzymatiques correspondants, sur les sérums des échantillons sanguins collectés. En effet, l'utilisation des traceurs enzymatiques permet de détecter la présence des anticorps spécifiques anti-Bz-Lysine. Ainsi, nous avons pu constater la présence dans les sérums d'anticorps spécifiques anti-Bz-Lysine et ceci dès la première récolte de sérum S1, le taux d'anticorps ne semble pas augmenter de façon significative suite aux trois autres rappels d'injection.

Il est alors aisé de déterminer l'énantiosélectivité de liaison de ces anticorps spécifiques en pratiquant les tests de compétition de liaison entre le traceur enzymatique et chaque énantiomères de la *N*-Bz-Lysine. Les meilleurs résultats, obtenus avec les sérums S4 des lapins L1728 et L 1730 sont présentés dans la figure 39.

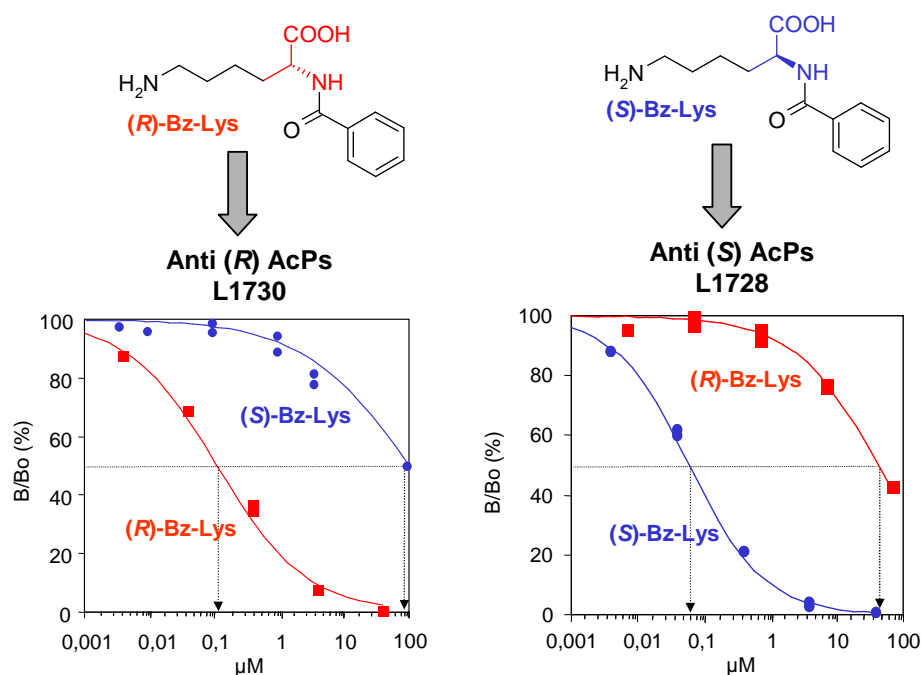
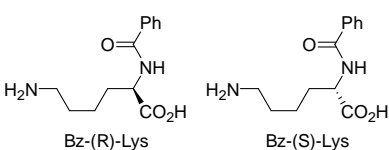


Figure 39. Reconnaissance énantiosélective de la *N*-Benzoyl-Lysine (Bz-Lys) par les anticorps polyclonaux (AcPs). Résultats obtenus avec les sérums S4. Conditions : dans les puits d'une plaque 96 puits sont additionnés 50 μ L de sérum (L 1730 ou L1728) dilué $1/10^6$, 50 μ L de traceur enzymatique (R) ou (S) à 2 UEll, 50 μ L de (R) ou (S)-Bz-Lys 10 nM à 100 μ M. Incubation 12 h à 4°C, lavages puis révélation de l'activité enzymatique par addition de 300 μ L du réactif d'Ellman.

Ainsi, ces résultats montrent clairement une forte énantiosélectivité des anticorps polyclonaux (AcPs) anti-*N*-Bz-Lys. Les affinités relatives obtenues suite aux expériences de compétition de liaison montrent une différence d'environ trois unités de grandeur dans la reconnaissance de chacun des énantiomères. Les affinités pour l'énantiomère le mieux reconnu sont de l'ordre de 0,1µM avec une réaction croisée de l'ordre de 0,1% pour l'énantiomère le moins reconnu, ce dernier est donc environ 1000 fois moins bien lié par les anticorps.

Il est intéressant de vérifier si cette forte énantiosélectivité est apparue dès le premier rappel d'immunisation où si celle-ci s'est affinée suite aux différents rappels (tableau 9).



Bz-(R)-Lys Bz-(S)-Lys

	Lapin	Sérums	B/Bo 50% (µM)	B/Bo 50% (µM)	Réaction croisée
AcPs anti (R).	L1729	S1	0,95	3,48	27,3%
		S2	0,57	1,32	43,2%
		S3	0,51	2,73	18,7%
		S4	0,42	1,52	27,6%
	L1730	S1	0,20	75,89	0,2%
		S2	0,27	68,90	0,4%
		S3	0,22	57,00	0,4%
		S4	0,14	92,42	0,1%
AcPs anti (S)	L1727	S1	56,60	0,28	0,5%
		S2	22,35	0,19	0,8%
		S3	9,50	0,09	1,1%
		S4	3,43	0,06	1,7%
	L1728	S1	303,66	0,38	0,1%
		S2	66,44	0,19	0,3%
		S3	36,00	0,10	0,2%
		S4	43,52	0,07	0,1%

Tableau 9. Enantiospécificité des différents sérums AcPs.

Les résultats présentés dans le tableau 9 montrent clairement que, si il y a eu une légère amélioration de l'affinité des anticorps suite aux différents rappels d'injection, leurs énantiosélectivités sont excellentes (à l'exception du sérum L1729) dès le premier rappel et n'évolue pas de façon notable par la suite. Ceci montre qu'il est possible, au moins dans le cas présent, d'obtenir des anticorps polyclonaux ayant les reconnaissances chirales requises pour l'élaboration d'un test de criblage dans un temps très court (le premier échantillon sanguin est obtenu après deux mois).

Les deux sérums sélectionnés (L1730 S4 et L1728 S4) sont ensuite utilisés dans une étape de validation du dosage qui consiste, comme décrit dans le chapitre précédent, à mesurer les excès énantiomériques de mélange de (R) et (S)-N-Bz-Lys dans différents rapports (figure 40).

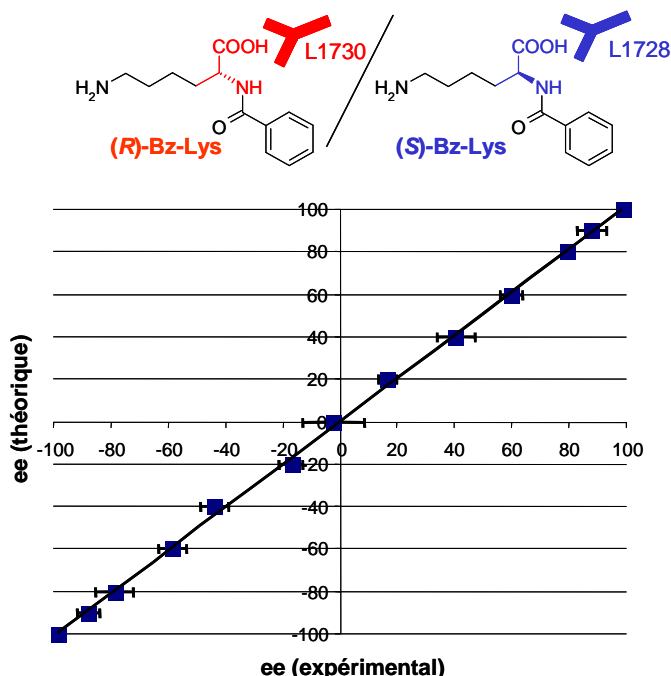


Figure 40. Validation du dosage. *Conditions* : dans les puits d'une plaque 96 puits sont additionnés 50 μ L de sérum (L 1730 ou L1728) dilué $1/10^6$, 50 μ L de traceur enzymatique (R) ou (S) à 2 Uell, 50 μ L de mélanges (R) + (S)-Bz-Lys dont la concentration globale est de 0,1 μ M. Incubation 12 h à 4°C, lavages puis révélation de l'activité enzymatique par addition de 300 μ L du réactif d'Ellman.

Une rapide analyse statistique de ces données confirme bien la fiabilité de ce dosage. La représentation de Bland/Altman¹²⁵ (figure 41) donne un intervalle de confiance pour la mesure de l'excès énantiomérique de $\pm 3\%$.

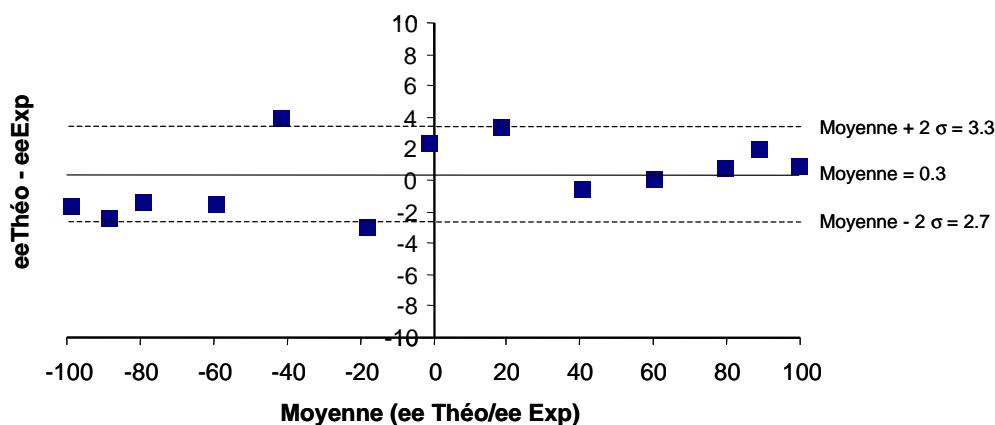


Figure 41. Représentation de Bland/Altman

¹²⁵ J.M. Bland, D.G. Altman, *Lancet* **1986**, 1, 307.

La valeur de cette précision de mesure de l'excès énantiomérique a toutefois été réalisée dans des conditions idéales c'est à dire avec des solutions de *N*-Benzoyl-Lysine pures, exemptes de résidus susceptibles d'interférer avec le dosage. Cette précision est souvent moins élevée lors de la mesure des *ee* de solutions brutes comme nous l'avons constaté dans le chapitre 2.

Ces résultats sont toutefois très encourageants et nous permettent d'envisager sereinement l'utilisation de ce test immunologique pour le criblage de catalyseurs générant des acides aminés *N*-benzoylés. Avant cela, il convient toutefois de vérifier la généralité de ce dosage c'est à dire sa capacité à mesurer l'excès énantiomérique d'une variété d'acides aminés.

Ceci revient à étudier la sélectivité de la reconnaissance anticorps vis-à-vis des différentes fonctions présentes sur les acides aminés *N*-benzoylés et en particulier vis-à-vis de leurs chaînes latérales.

I.2. Caractérisation des propriétés de liaison des anticorps polyclonaux anti-*N*-Benzoyl-Lysine

Comme nous l'avons mentionné précédemment le mode d'ancrage de l'haptène *N*-Bz-Lys à la protéine porteuse devrait être à l'origine d'une production d'anticorps ayant des propriétés de liaison spécifique fortes pour le centre chiral et probablement plus faible pour la chaîne latérale (figure 42). Les premiers résultats décrits plus haut concernant l'énantiospécificité de liaison vis-à-vis de l'haptène *N*-Bz-Lys semblent confirmer le premier point de cette hypothèse.

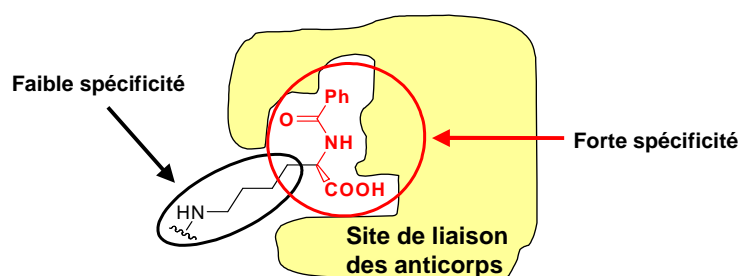


Figure 42. Propriétés de liaison hypothétiques des anticorps polyclonaux anti-*N*-Benzoyl-Lysine.

Les travaux suivants qui consistent à réaliser des expériences de compétition de liaison avec une série de composés structurellement liés à celle de l'haptène initial tentent de confirmer l'ensemble des hypothèses concernant les capacités de liaison spécifiques des AcPs.

I.2.1. Spécificité des anticorps polyclonaux autour de la chaîne latérale

Afin de pouvoir évaluer cette éventuelle spécificité de liaison, il convient dans un premier temps de synthétiser une série d'acides aminés *N*-benzoylés. Ces synthèses sont aisément réalisées dans les conditions de Schotten et Baumann¹²⁶ par réaction à température ambiante des acides aminés correspondants avec le chlorure de benzoyle en présence de base (NaOH aqueux). Une série de 14 acides aminés *N*-benzoylés variant par la structure de la chaîne latérale a été ainsi préparée avec de bons rendements en série (*R*) et (*S*), soit au total 28 composés (schéma 69).

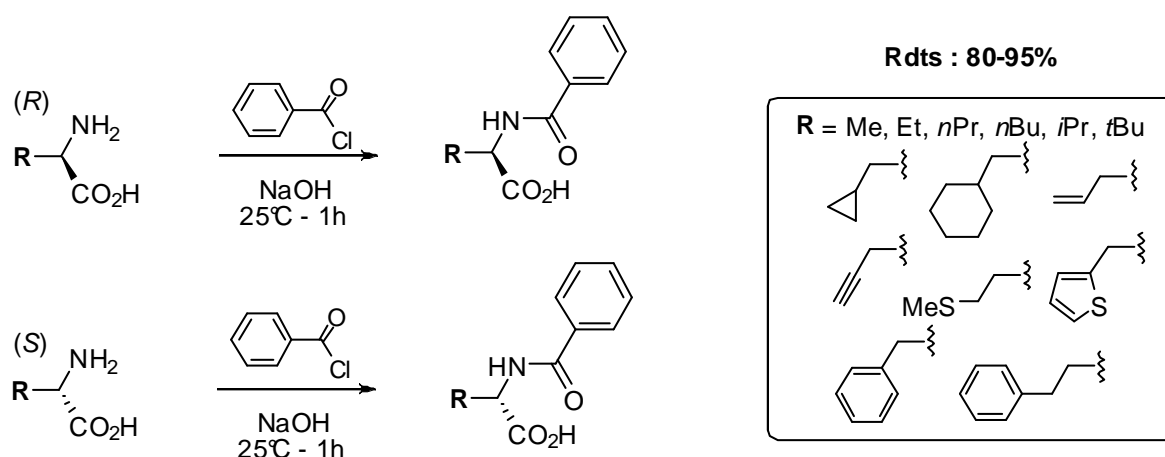


Schéma 69. Synthèse des acides aminés (*R*) et (*S*) *N*-benzoylés

En raison des conditions réactionnelles (léger excès de chlorure de benzoyle), l'acide benzoïque, sous produit de la réaction, doit être éliminé. Lorsque la purification des acides aminés *N*-benzoylé s'est avérée trop délicate à mettre en œuvre par chromatographie sur colonne ouverte, nous avons opté pour une purification par CLHP préparative (voir partie expérimentale). D'autre part, nous nous sommes assurés par analyse par CLHP sur colonne chirale que les

¹²⁶ a) C. Schotten, *Ber.* **1884**, *17*, 2544; b) E. Baumann, *Ber.* **1886**, *19*, 3218.

conditions basiques utilisées lors de cette étape de synthèse n'entraînaient pas de racémisation des composés.

Disposant de l'ensemble de ces dérivés d'acides aminés nous avons réalisé les expériences de compétition de liaison par les techniques ELISA usuelles. Les propriétés de liaison de chaque polyclonal (anti-(*R*) et anti-(*S*)) pour les deux énantiomères de chaque acides aminés *N*-benzoylés ont été ainsi estimées (tableau 10).

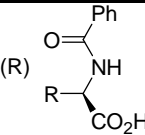
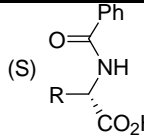
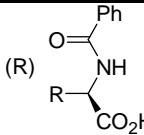
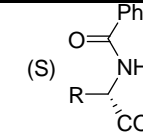



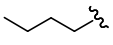



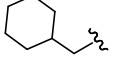


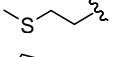
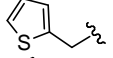
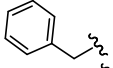
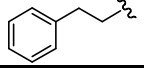
	AcPs anti-(<i>R</i>) (L1730)			AcPs anti-(<i>S</i>) (L1728)		
	 (<i>R</i>)	 (<i>S</i>)		 (<i>R</i>)	 (<i>S</i>)	
R	B/Bo 50% (μM)	B/Bo 50% (μM)	Réaction croisée	B/Bo 50% (μM)	B/Bo 50% (μM)	Réaction croisée
	0,30	61,70	0,4%	530,00	5,60	1,1%
	0,25	96,61	0,2%	58,02	0,16	0,3%
	0,11	40,80	0,3%	25,60	0,04	0,2%
	0,05	35,26	0,1%	27,54	0,05	0,2%
	0,06	167,45	< 0,1%	103,91	0,30	0,3%
	0,43	150,23	0,3%	150,62	1,42	0,9%
	0,06	10,05	0,6%	175,68	0,09	< 0,1%
	0,03	2,74	1,1%	13,35	0,19	1,4%
	0,53	141,25	0,4%	148,69	0,81	0,5%
	0,67	125,36	0,5%	117,75	0,16	0,1%
	0,08	4,47	1,8%	108,62	0,14	0,1%
	0,23	111,82	0,2%	185,24	0,19	0,1%
	0,21	33,62	0,6%	39,30	0,10	0,2%
	0,10	24,13	0,4%	35,26	0,10	0,3%

Tableau 10. Enantiospécificité des AcPs anti-*N*-Benzoyl-Lysine.

Ces résultats montrent clairement que l'énantiosélectivité de liaison des AcPs est conservée et ceci quelque soit la nature de la chaîne latérale des acides aminés *N*-benzoylés. Les différences d'affinité relatives entre les deux énantiomères de chaque dérivés sont globalement

de 2 à 3 ordres de grandeur et ceci pour les deux types de polyclonaux comme en témoignent les valeurs de réactions croisées.

Ces données démontrent qu'il est possible d'utiliser ces anticorps polyclonaux pour le criblage de conditions réactionnelles générant un large panel d'acides aminés *N*-benzoylés permettant de ce fait la mise en place d'un test de criblage pouvant estimer la généralité d'un catalyseur.

Pour compléter cette étude concernant la caractérisation des propriétés de liaison des AcPs, nous avons entrepris une série d'expériences mettant en jeu des acides aminés variant structurellement au niveau du groupement benzoylé.

I.2.2. Spécificité des anticorps polyclonaux pour le groupement *N*-Benzoylé.

Trois types de groupements ont été introduits sur la fonction amine primaire de l'acide aminobutyrique en lieu et place du groupement benzoyl : un groupement acétyl, benzyl et tosyl. Ces synthèses ont été réalisées par le Dr. Paola Vincennati, post-doc au laboratoire. L'étude des capacités de liaison de ces composés par les AcPs confirment, comme prévu, la très forte spécificité de ces anticorps pour le groupement benzoyl (tableau 11).

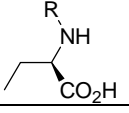
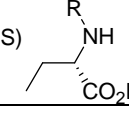
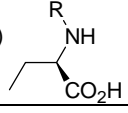
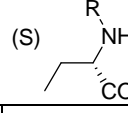
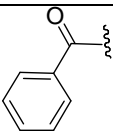

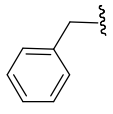
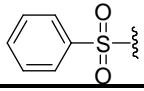
R	AcPs anti-(R) (L1730)			AcPs anti-(S) (L1728)		
	(R) 	(S) 		(R) 	(S) 	
	B/Bo 50%	B/Bo 50%	Réaction croisée	B/Bo 50%	B/Bo 50%	Réaction croisée
	0,25 μM	96,61 μM	0,2%	58,02 μM	0,16 μM	0,3%
	> 10 mM	> 10 mM	-	> 10 mM	> 10 mM	-
	> 10 mM	> 10 mM	-	> 10 mM	> 10 mM	-
	1,02 mM	10,45 mM	9,8%	1,10 mM	0,25 mM	23%

Tableau 11. Spécificité de liaison des AcPs anti-*N*-Benzoyl-Lysine.

Seul le dérivé *N*-tosyl garde la capacité de se lier aux anticorps mais avec une affinité plus de 1000 fois moindre que le composé *N*-benzoyl avec de surcroît une chute de l'énantiosélection.

Ainsi, l'ensemble de ces expériences confirment l'hypothèse de travail émise au début de ces travaux : il est effectivement possible de produire des anticorps polyclonaux suffisamment énantiosélectifs pour mettre au point une technique de criblage de catalyseurs asymétriques à moindre coût. En choisissant judicieusement le mode d'ancrage il est également possible d'anticiper sur les propriétés de liaison de ces anticorps et ainsi de concevoir un test pouvant s'appliquer à un panel de substrats.

II. Utilisation des anticorps polyclonaux énantiosélectifs.

Nous disposons donc d'une méthode de criblage permettant de suivre la formation énantiosélective d'acides aminés *N*-benzoylés. Il existe un grand nombre de transformations chimiques conduisant à ces composés et bon nombre d'entre elles ont une version énantiosélective.¹²⁷ L'objectif de ce travail n'est pas de concurrencer les méthodes de préparations d'acides aminés optiquement purs déjà décrites mais plutôt de démontrer que l'outil analytique mis au point précédemment peut être utilisé comme moyen efficace de sélection de catalyseurs et de conditions opératoires.

II.1. Réaction cible

Parmi les nombreuses méthodes de préparation d'acides aminés optiquement enrichis, notre choix s'est porté sur l'ouverture énantiosélective des 5(4*H*)-oxazolones par de l'eau (schéma 70).

¹²⁷ a) C. Nájera, J.M. Sansano, *Chem. Rev.* **2007**, 107, 4584; b) C.J. Easton, *Chem. Rev.*, **1997**, 97, 53; c) K. Maruoka, T. Ooi, *Chem. Rev.* **2003**, 103, 3013.

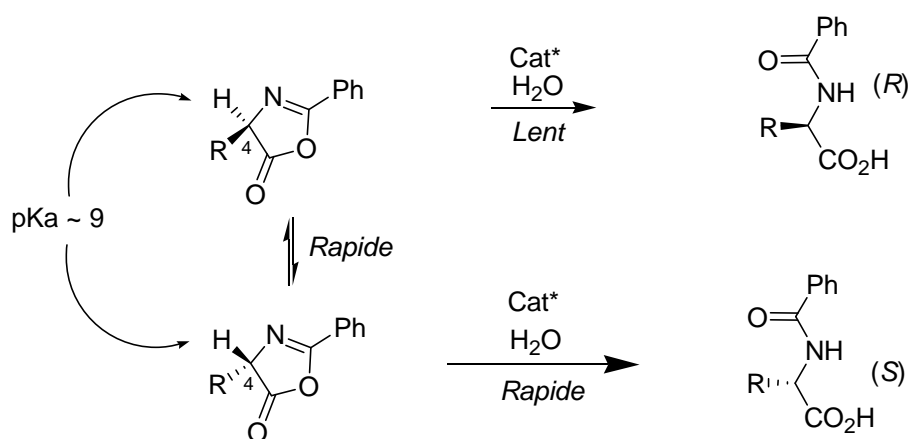


Schéma 70. Ouverture d'oxazolones par dédoublement cinétique dynamique.

L'ouverture énantiosélective de ces hétérocycles est basée sur le phénomène de résolution cinétique dynamique.¹²⁸ En effet, le proton en position 4 étant relativement acide ($pK_a \sim 9$),¹²⁹ les oxazolones peuvent être facilement racémisées dans le milieu réactionnel. En présence d'un catalyseur asymétrique efficace un énantiomère sera plus rapidement hydrolysé que l'autre conduisant à l'acide aminé *N*-benzoylé énantiomériquement enrichi (en énantiomère (*S*) dans le cas du schéma 70). Ce processus présente l'avantage, par rapport à la résolution cinétique « classique », de permettre en théorie un taux de conversion quantitatif en produit souhaité.

Pour que le processus soit efficace, il est nécessaire de se placer dans des conditions réactionnelles limitant au minimum l'ouverture spontanée (non catalysée) de l'oxazolone, phénomène qui induirait une chute des excès énantiomériques. Cette ouverture spontanée dépend de la nature de l'oxazolone mais surtout du pH de la réaction.

L'ouverture énantiosélective des 5(4*H*)-oxazolones par de l'eau n'a été reportée que sporadiquement dans la littérature (voir ci-dessous). Cette réaction nous intéresse tout particulièrement pour plusieurs raisons : *i*) elle utilise de l'eau comme réactif ce qui présente un intérêt au niveau du coût et de l'environnement, *ii*) elle génère directement des acides aminés déprotégés au niveau de la fonction acide carboxylique (à la différence de l'alkoolyse) et *iii*) nous pouvons envisager son utilisation pour la synthèse d'acides aminés marqués au deutérium et/ou à l'oxygène 18.

¹²⁸ H. Pellissier, *Tetrahedron* **2003**, 59, 8291.

¹²⁹ J. de Jersey, B. Zerner, *Biochemistry* **1969**, 8, 1967.

En revanche, de façon similaire à la réaction d'insertion étudiée dans le chapitre 2, l'ouverture énantiosélective des oxazolones par de l'eau est probablement plus délicate, en raison de sa très petite taille, que celle impliquant l'utilisation d'alcools.

II.2. Rappels bibliographiques

II.2.1. Ouverture des 5(4*H*)-oxazolones catalysée par des organocatalyseurs chiraux.

L'équipe de G. Fu a été l'une des premières à s'intéresser à l'ouverture d'oxazolone à l'aide d'organocatalyseurs chiraux. Cette équipe a notamment développé un analogue chiral de la DMAP qui catalyse efficacement cette réaction (tableau 12).¹³⁰

Essai	R	R'	Rdt (%)	e.e. (%)
1	CH ₃ -	CH ₃ -	98	54
2	CH ₃ -CH ₂ -	CH ₃ -	94	44
3		CH ₃ -	94	61
4		CH ₃ -	95	55
5		CH ₃ -	93	54
6		CH ₃ -	94	56
7		CH ₃ -	94	50
8	CH ₃ -	CH ₃ -CH ₂ -	> 95	53
9	CH ₃ -		> 95	78

Tableau 12. Ouverture d'oxazolone par un dérivé chiral de la DMAP.

¹³⁰ J. Liang, J.C. Ruble, G.C. Fu, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 3154.

Les excès énantiomériques sont de façon globale moyens, ils peuvent être améliorés par l'emploi d'alcools encombrés (essai 9) mais dans ce cas la cinétique d'alcoolyse est très lente (plusieurs semaines sont nécessaires pour que l'essai 9 soit complet).

Plus récemment, un concept intéressant d'organocatalyseur « bifonctionnel » a été introduit par l'équipe de A. Berkessel concernant l'alcoolyse d'oxazolone.¹³¹ La conception de ces catalyseurs repose sur la présence de trois critères structuraux : 1) une structure de type urée ou thiourée susceptible d'établir des liaisons hydrogène avec le substrat et ainsi établir une reconnaissance, 2) une base de Bronsted jouant le rôle de catalyseur basique et 3) un espaceur chiral reliant les deux premières entités. Ce concept s'est avéré efficace : les catalyseurs obtenus sont les plus performants décrits à ce jour concernant l'ouverture énantiosélective d'oxazolone (schéma 71).

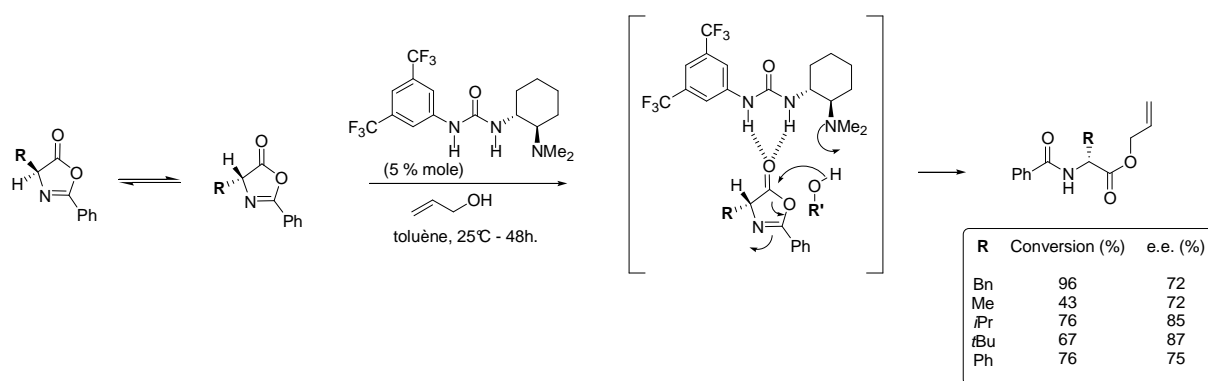


Schéma 71. Ouvreure d'oxazolone par une amine chirale dérivée d'urée.

II.2.2. Ouvreure des 5(4*H*)-oxazolones catalysée par des complexes organométalliques chiraux.

Très peu d'exemples peuvent être trouvés dans la littérature concernant l'ouverture d'oxazolones par des complexes organométalliques jouant le rôle d'acides de Lewis chiraux. Les travaux les plus significatifs dans ce domaine viennent de l'équipe de D. Seebach¹³² décrivant l'utilisation de complexes chiraux du titane (schéma 72).

¹³¹ A. Berkessel, F. Cleemann, S. Mukherjee, T.N. Müller, J. Lex, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 807.

¹³² K. Gottwald, D. Seebach, *Tetrahedron* **1999**, 55, 723.

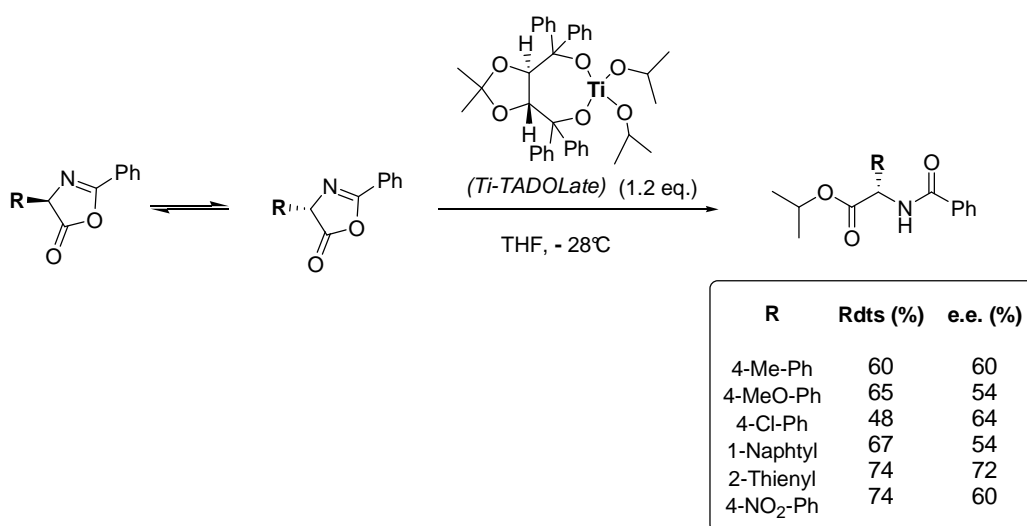


Schéma 72. Ouverture d'oxazalone par un complexe du titane chiral.

Il est à noter que les excès énantiomériques sont modestes et que surtout le complexe *Ti-TADDOLate* doit être utilisé en sur-stœchiométrie par rapport au substrat pour permettre une conversion convenable.

II.2.3. Ouverture des 5(4*H*)-oxazolones catalysée par des enzymes.

Comme nous venons de le voir les catalyseurs chimiques décrit à ce jour ne sont que d'une efficacité relative sur cette réaction surtout si l'on souhaite de haute valeur de *ee*. En revanche, les enzymes sont bien connues pour leurs exceptionnelles performances catalytiques.

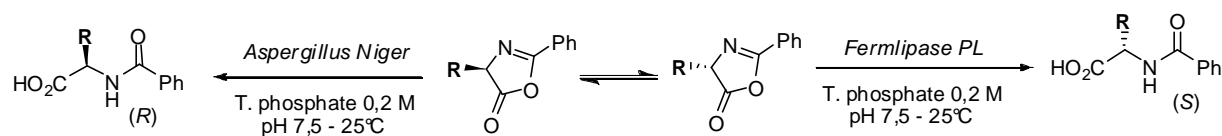
A notre connaissance, seulement deux publications traitent de l'hydrolyse énantiosélective des 5(4*H*)-oxazolones par des lipases.¹³³

Deux lipases ont été tout particulièrement étudiées en raison de leur efficacité : la *Fermlipase PL*, lipase extraite de pancréas de porc, qui catalyse la formation d'acides aminés naturels (*S*) et la lipase d'*Aspergillus Niger*, une lipase catalysant la formation d'acides aminés non naturels (*R*).

Les auteurs de ces travaux ont mis au point un protocole permettant un taux de conversion quantitatif des 5(4*H*)-oxazolones en acides aminés *N*-benzoylés correspondants : les réactions sont réalisées en présence de quantité massique en enzyme équivalente à celle du substrat dans du tampon phosphate 0,2 M à pH 7,5, valeur de pH correspondant à l'activité optimum des enzymes selon les auteurs. Un nombre conséquent de substrats oxazolones a été

¹³³ a) R.-L. Gu, I.-S. Lee, C.J. Sih, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 1953; b) J.Z. Crich, R. Brieva, P. Marquart, R.L. Gu, S. Flemming, C.J. Sih, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 3252.

utilisé afin d'étudier la spécificité de ces enzymes ainsi que leur efficacité en terme d'excès énantiomérique (dans tous les cas la conversion a été quantitative). L'ensemble des résultats est résumé dans le tableau 13.



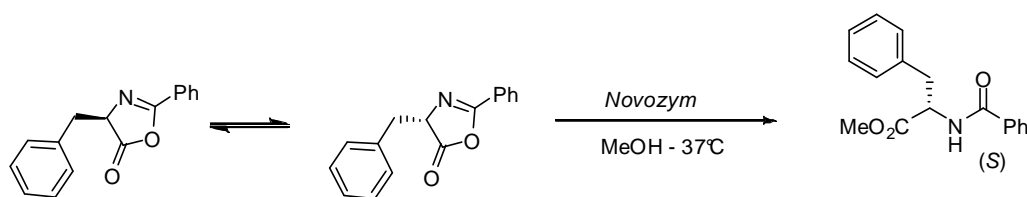
R	Lipase	Temps de réaction (h)	ee (%)
	<i>Aspergillus Niger</i>	18	6 (R)
	<i>Fermlipase PL</i>	18	87 (S)
	<i>Aspergillus Niger</i>	5	83 (R)
	<i>Fermlipase PL</i>	16	80 (S)
	<i>Aspergillus Niger</i>	90	20 (R)
	<i>Fermlipase PL</i>	90	20 (S)
	<i>Aspergillus Niger</i>	20	80 (R)
	<i>Fermlipase PL</i>	20	76 (S)
	<i>Aspergillus Niger</i>	17	> 99 (R)
	<i>Fermlipase PL</i>	42	> 99 (S)
	<i>Aspergillus Niger</i>	48	30 (R)
	<i>Fermlipase PL</i>	48	33 (S)
	<i>Aspergillus Niger</i>	168	15 (R)
	<i>Fermlipase PL</i>	120	67 (S)
	<i>Aspergillus Niger</i>	46	57 (R)
	<i>Fermlipase PL</i>	46	52 (S)
	<i>Aspergillus Niger</i>	20	37 (R)
	<i>Fermlipase PL</i>	20	19 (S)
	<i>Aspergillus Niger</i>	24	57 (R)
	<i>Fermlipase PL</i>	24	61 (S)
	<i>Aspergillus Niger</i>	100	34 (R)
	<i>Fermlipase PL</i>	100	55 (S)
	<i>Aspergillus Niger</i>	30	20 (R)
	<i>Fermlipase PL</i>	30	55 (S)
	<i>Aspergillus Niger</i>	24	85 (R)
	<i>Fermlipase PL</i>	24	60 (S)

Tableau 13. Action des enzymes *Aspergillus Niger* et *Fermlipase PL* sur l'hydrolyse de 13 substrats oxazolones.

Ces travaux montrent clairement que la cinétique d'hydrolyse ainsi que les valeurs d'excès énantiomériques dépendent grandement de la nature de la chaîne latérale en position 4. Dans tous les cas la conversion a été menée jusqu'au bout. Dans ces conditions, l'hydrolyse non enzymatique des 5(4*H*)-oxazolones est un phénomène non négligeable qui dépend également de la structure du substrat. Des résultats remarquables sont obtenus avec le substrat portant un groupement benzyl en position 4 puisque les acides aminés (*S*) et (*R*) sont obtenus optiquement purs. En ce qui concerne les autres substrats, les valeurs de *ee* sont très variables : de 6 à 85%.

Des travaux ont également été réalisés sur la réaction d'alcoololyse des 5(4*H*)-oxazolones catalysée par des lipases. Dans ce cas, l'enzyme *Lipase de Candida antarctica B* (appelé aussi Novozym) a été l'enzyme le plus étudié.

Des travaux d'optimisation menés sur un substrat modèle ont dans un premier temps montré l'influence du solvant et de la présence de base sur l'efficacité enzymatique (tableau 14). Les expériences ont été menées en utilisant 2 à 3 équivalents d'alcool en présence d'enzyme préalablement séchée sur P₂O₅, séchage qui d'après les auteurs de ces travaux permet d'améliorer les performances enzymatiques¹³⁴.



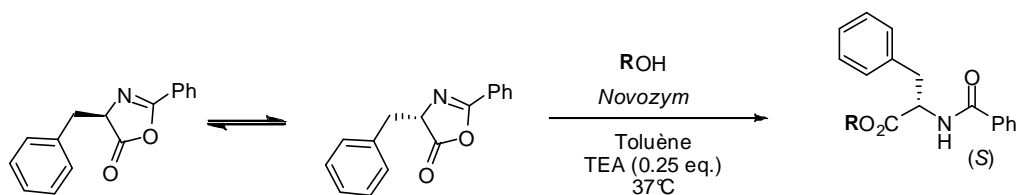
Essai	Solvant	Sans TEA		Avec 0,25 eq. de TEA	
		Rdt (%)	<i>ee</i> (%)	Rdt (%)	<i>ee</i> (%)
1	CH ₂ Cl ₂	65	75	78	89
2	CHCl ₃	63	83	99	75
3	THF	71	97	64	95
4	Et ₂ O	90	58	87	97
5	<i>t</i> BuOMe	91	34	90	96
6	Toluène	82	71	82	94
7	CH ₃ CN	88	98	44	97

Tableau 14. Influence du solvant et de la présence de base (triéthylamine) sur le rendement et l'excès énantiomérique de l'ouverture par le méthanol d'une oxazolone catalysée par le Novozym (*Lipase de Candida antarctica B*).

¹³⁴ S.A. Brown, M.-C. Parker, N.J. Turner, *Tetrahedron:Asymmetry* **2000**, 1687.

L'acétonitrile (essai 7) mais aussi un mélange toluène/TEA (essai 6) se sont avérés être les solvants de choix pour cette biocatalyse. Il est à noter que l'influence de la présence de TEA, dont le rôle est d'aider à la racémisation de l'oxazolone, est très variable induisant dans certains cas une amélioration des excès énantiomériques (essais 4 et 5) et dans d'autres cas une chute des rendements (essais 3 et 7).

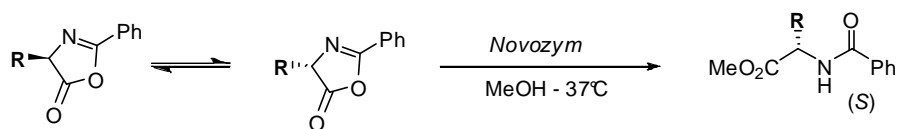
Il a aussi été démontré que cet enzyme acceptait une variété d'alcools comme substrats (tableau 15).



Essai	R	Rdt (%)	ee (%)
1	CH ₃ -	79	94
2	CH ₃ -CH ₂ -	82	97
3	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -	83	97
4	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -	81	95
5	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -	32	88

Tableau 15. Influence de la nature de l'alcool sur le rendement et l'excès énantiomérique de l'ouverture d'une oxazolone catalysée par le Novozym (*Candida antarctica B*).

Enfin, cet enzyme tolère également un certain nombre de variations structurales en position 4 des oxazolones permettant la préparation d'α-amino-esters optiquement enrichis (tableau 16). Les deux conditions optimales établies préalablement ont été utilisées dans ces expériences. L'emploi de toluène en présence de TEA donne en général des résultats légèrement meilleurs.



Essai	R	Conditions	Rdt (%)	ee (%)
1		CH ₃ CN	88	98
		Toluène/TEA	81	95
2		CH ₃ CN	96	97
		Toluène/TEA	96	97
3		CH ₃ CN	83	97
		Toluène/TEA	82	95
4		CH ₃ CN	79	73
		Toluène/TEA	69	80
5		CH ₃ CN	0	-
		Toluène/TEA	40	35

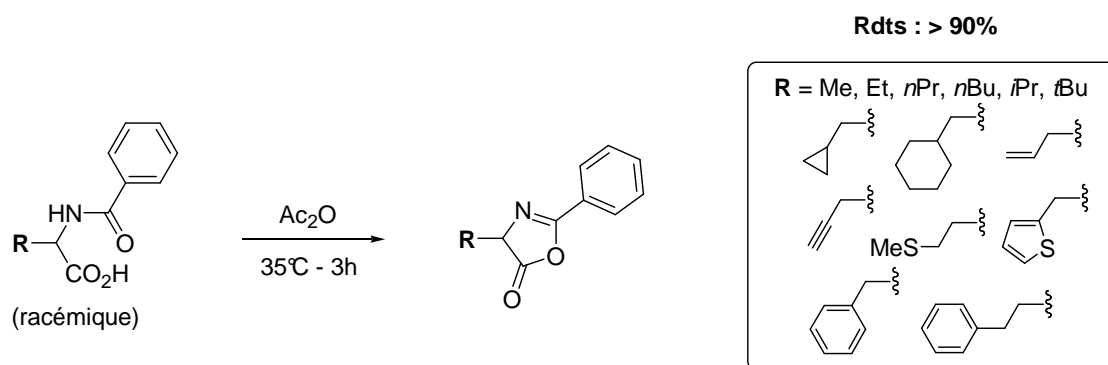
Tableau 16. Influence de la nature de la chaîne latérale de substrats oxazolones sur le rendement et l'excès énantiomérique des réactions d'alcoolyses catalysées par le Novozym (*Lipase de Candida antarctica B*).

Comme nous venons de le voir, l'ouverture énantiosélective des oxazolones peut être réalisée par des catalyseurs de nature très différente. Au cours de ce travail de thèse, nous avons focalisé nos efforts essentiellement sur l'utilisation de lipases pour catalyser l'ouverture de ces hétérocycles. En effet, l'outil de criblage décrit précédemment devrait permettre de d'évaluer rapidement l'efficacité catalytique d'une série de lipases vis-à-vis de plusieurs substrats et ainsi d'établir un profil de spécificité de ces enzymes.

II.3. Résultats

II.3.1. Synthèse d'une série de 5(4*H*)-oxazolones.

La préparation des oxazolones a été réalisée par action sur les acides aminés *N*-benzoylés correspondants de l'anhydride acétique (schéma 73). Cette méthode, reportée dans la littérature,¹³⁵ conduit aux produits attendus avec de bons rendements.



II.3.2. Mise au point des conditions de catalyse

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe bibliographique, l'ouverture des oxazolones catalysée par des lipases est influencée par un ensemble de paramètres tels que le solvant, l'ajout de base et le pH de l'eau.

Les conditions décrites dans la littérature concernant l'hydrolyse énantiosélective des 5(4*H*)-oxazolones à l'aide de lipases utilisent l'eau comme solvant (la réaction est effectuée dans un tampon). Nous avons souhaité modifier ces conditions réactionnelles car elles ne sont guère compatibles avec une application de marquage. En effet, comme nous l'avons mentionné plus haut, nous envisageons d'appliquer cette réaction à la préparation d'acides aminés marqués au deutérium ou à l'oxygène 18. Dans cette optique, il est nécessaire d'utiliser un minimum de matière première marquée (D₂O ou H₂¹⁸O).

¹³⁵ M. Goodman, C.B. Glaser, *J. Org. Chem.* **1970**, 35, 1954.

Ainsi, basés sur les études décrites dans la littérature concernant l'alkoolyse des 5(4*H*)-oxazolones, nous avons entrepris un ensemble d'expérience : 5 solvants ont été utilisés, nous avons aussi évalué l'influence de la présence de base (TEA) dans la réaction, l'ensemble de ces conditions opératoires a été appliqué à 10 lipases différentes. L'oxazolone ayant un groupement *n*Pr sur la chaîne latérale a été utilisée comme substrat modèle.

L'ensemble de ces 60 catalyses a été par la suite criblé à l'aide du dosage immunologique mettant en jeu les ACPs énantiosélectifs, les résultats sont résumés sous forme de code couleur dans la figure 43.

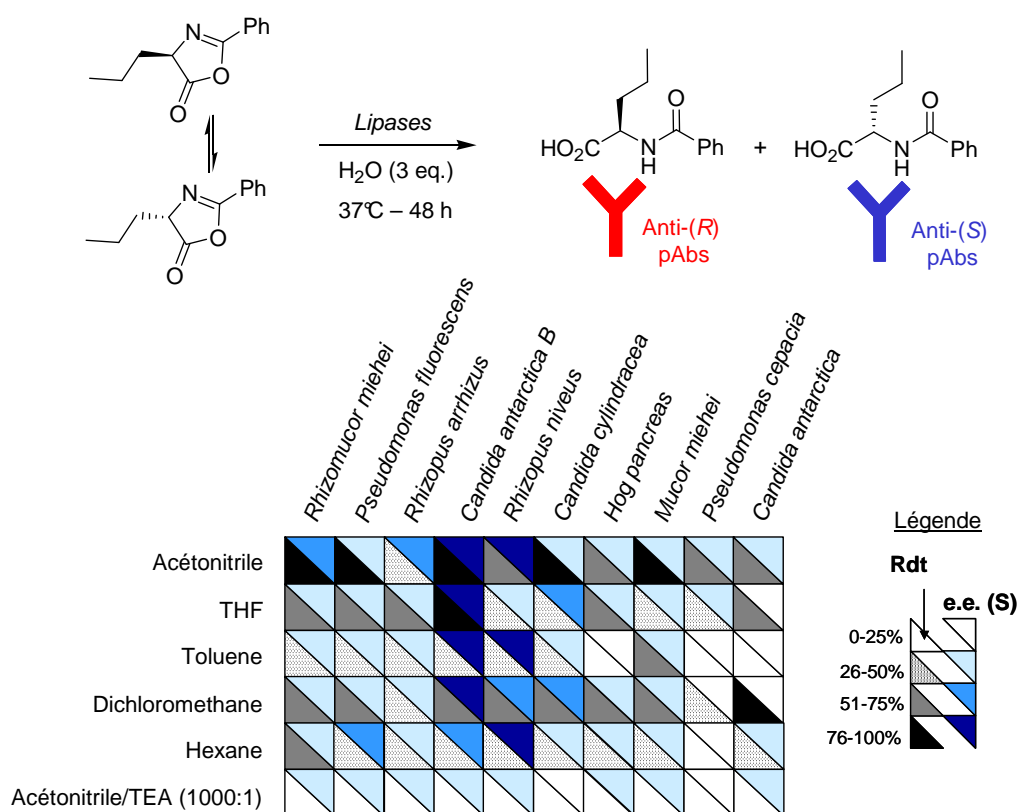


Figure 43. Influence du solvant sur l'efficacité enzymatique d'une série de lipases pour l'ouverture énantiosélective d'une oxazolone. Conditions : 9,85 μ moles d'oxazolone, lipases 2 UE, H_2O 3 eq., CH_3CN 20 μ L, 37°C – 48 h.

Ces résultats montrent clairement que, dans nos conditions opératoires, l'ajout de TEA est néfaste à l'activité enzymatique induisant une chute drastique à la fois du rendement mais aussi de l'excès énantiomérique ceci quelque soit l'enzyme utilisé. L'acétonitrile est le solvant de choix : pratiquement tous les enzymes testés donnent de meilleurs résultats lorsqu'ils sont utilisés dans ce solvant. Parmi les 10 lipases utilisées, l'enzyme *Lipase de Candida antarctica B* s'avère le plus actif, de bons *ee* sont obtenus dans 4 solvants différents. L'ensemble de ces résultats rejoignent globalement ceux décrits dans la littérature (à l'exception des résultats obtenus avec la TEA).

Le meilleur résultat de cette série d'expérience est obtenu avec l'enzyme *Lipase de Candida antarctica B* dans l'acétonitrile. L'analyse par dosage immunologique donne un rendement quantitatif avec un excès énantiomérique de 94% en faveur de l'énantiomère (*S*). Nous avons analysé ce même échantillon par CLHP, les résultats ($R_{dt} > 95\%$, $ee = 91\%$) confirment ceux obtenus par analyse immunologique (figure 44)

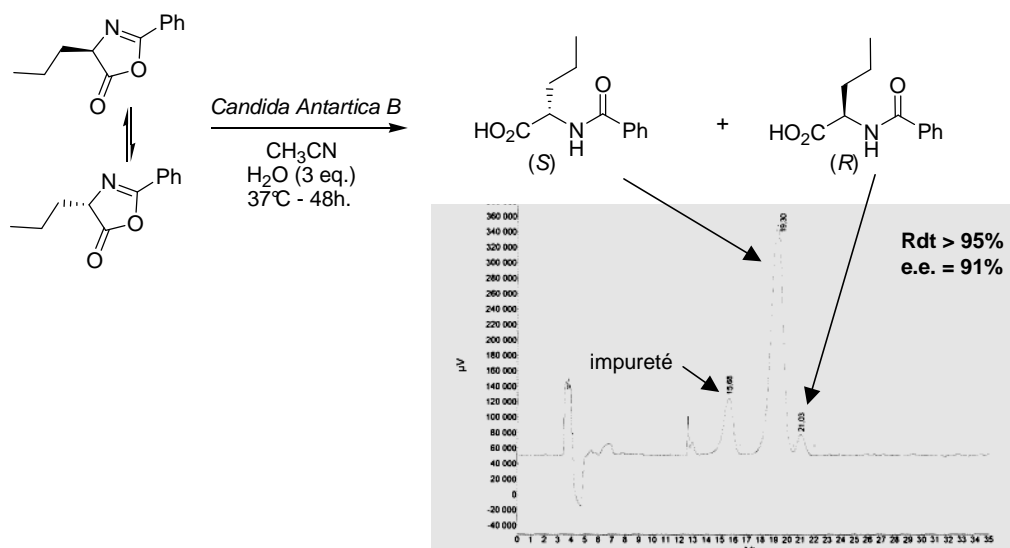


Figure 44. Chromatogramme du mélange réactionnel brut de l'hydrolyse par lipase de *Candida antarctica B* d'une oxazolone dans l'acétonitrile. Conditions d'analyse CLHP : colonne Chiralpak AD, éluant : hexane/EtOH/TFA (95/5/0,1), débit : 1 mL/mn, détection UV à 226 nm.

II.3.3. Criblage d'une série d'enzymes pour l'ouverture énantiosélective de 11 oxazolones.

Forts de ces résultats, nous avons entrepris une série d'expériences dont l'objectif est d'évaluer le profil de spécificité de substrat de 9 lipases différentes. Ainsi, nous avons combiné ces 9 enzymes avec 11 oxazolones différentes. Chaque combinaison est menée en parallèle à 37°C dans de l'acétonitrile, solvant choisi suite aux études d'optimisation décrites précédemment. Des expériences témoins menées en absence d'enzyme ont également été réalisées afin d'estimer l'hydrolyse spontanée des oxazolones. Au total, une centaine d'expérience a été réalisée, l'ensemble a été par la suite testé à l'aide du test immunologique utilisant les AcPs énantiosélectifs. En pratique, les échantillons bruts de catalyse sont dilués ($\sim 1/10^4$) puis transférés dans des plaques filles recouvertes d'anticorps énantiosélectifs, le traceur enzymatique est alors additionné et la compétition de liaison s'opère pendant 12h à 4°C. Après

révélation de l'activité enzymatique, la quantification de la concentration de chaque énantiomère est réalisée.

L'ensemble des résultats est présenté selon un code couleur, pour des raisons de clarté, dans la figure 45.

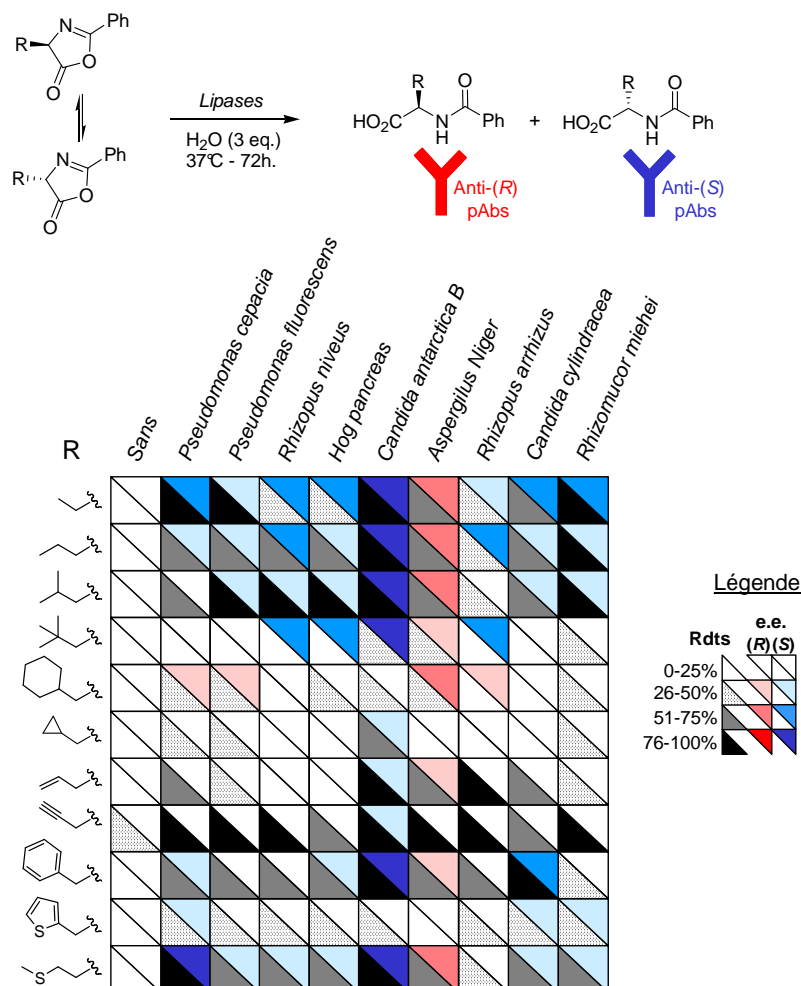


Figure 45. Profil de sélectivité de 9 lipases pour l'ouverture énantiosélective de 11 oxazolones. Conditions : 9,85 μ moles d'oxazolone, lipases 2 UE, H_2O 3 eq., CH_3CN 20 μ L, 37°C – 72 h.

De ces résultats ressortent plusieurs points :

- L'enzyme *Lipase de Candida antarctica B* est clairement l'enzyme la plus efficace dans bon nombre de cas. Son panel de substrat est le plus étendu ce qui en fait le catalyseur le plus général de la série testée.
- Les substrats encombrés tel que celui ayant un groupement tBu sont très faiblement hydrolysés et ceci quelque soit l'enzyme utilisé.
- Les oxazolones comportant un cycloalcane (cyclopropane ou cyclohexane) sont mal hydrolysés quelque soit l'enzyme utilisé.

- Dans le cas de l'oxazolone ayant un groupement cyclohexane sur la chaîne latérale, on observe une inversion de sélectivité des enzymes sauf dans le cas de l'enzyme *Lipase d'Aspergillus Niger*. Ce résultat très surprenant a été confirmé par CLHP.
- L'oxazolone ayant un groupement propargyl subit une ouverture spontanée dans les conditions réactionnelles ce qui doit être en partie la raison pour laquelle les excès énantiomériques obtenus avec ce substrat sont très faibles.

Un certain nombre d'échantillons ($n = 55$) ont également été analysés par CLHP et les résultats ont été comparés avec ceux obtenus par immunoanalyse. La figure ci-dessous montre les corrélations obtenues entre les deux méthodes pour la détermination des rendements chimiques et des *ee*.

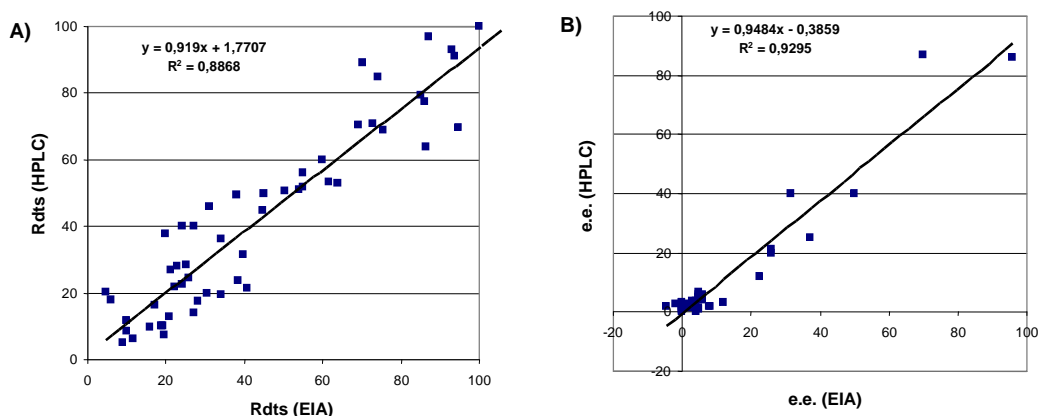


Figure 46. Corrélations CLHP/dosage immunologique (EIA) pour la détermination du rendement (A) et des excès énantiomériques (B).

La représentation de Bland/Altman (ci-dessous) donne un intervalle de confiance pour la mesure des rendements et celle des *ee* à l'aide du dosage immunologique de $\pm 10\%$.

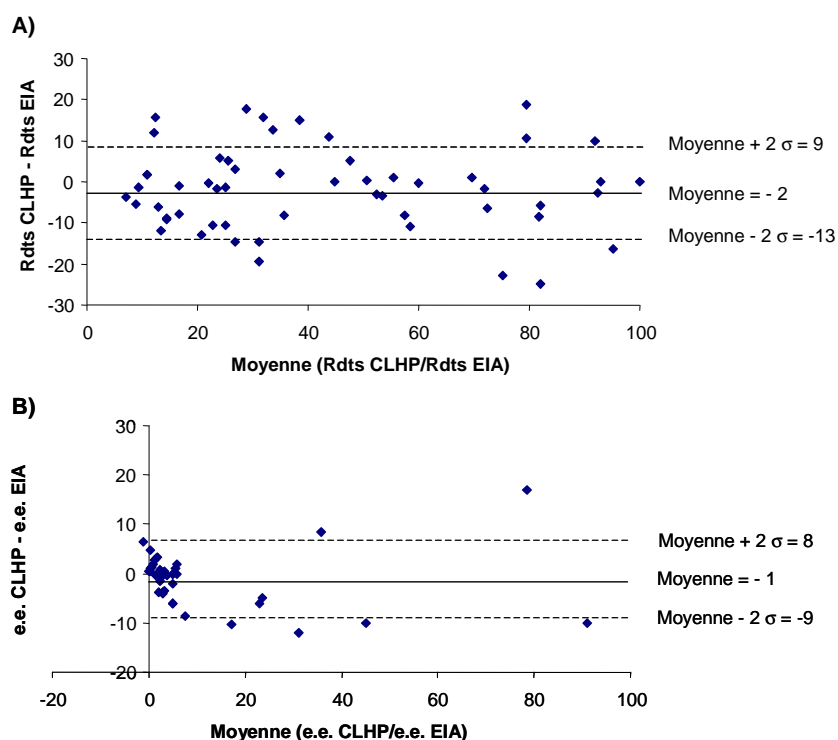


Figure 47. Représentation de Bland/Altman pour la mesure des rendements (A) et celle des excès énantiomériques (B).

La méthode de criblage que nous avons mis au point n'est donc pas d'une grande précision mais trouve toute son utilité dans une optique de criblage de première intention dont l'objectif est de mettre en évidence les combinaisons les plus actives.

II.3.4. Application à la préparation d'acides aminés *N*-benzoylés marqués.

Nous avons souhaité tirer profit de cette réaction en l'appliquant à la préparation d'acides aminés énantiio-enrichis marqués. En effet, en utilisant de l'eau marquée (D_2O ou $H_2^{18}O$) l'incorporation de l'isotope devrait être effective et conduire à des composés d'intérêt. En effet, on peut mentionner ici que les acides aminés marqués aux isotopes stables (tels que 2H et ^{18}O) représentent des matériaux aidant l'investigation du métabolisme des acides aminés dans les organismes et permettent aussi l'élucidation des mécanismes biosynthétiques¹³⁶. De même, ces

¹³⁶ a) T. Furuta, H. Takahashi, Y. Kasuya, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3633; b) D.E. Stevenson, M. Akhtar, D. Gani, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 5661; c) J.E. Baldwin, R.M. Adlington, H.H. Ting, D. Arigoni, P. Graf, B. Martinoni, *Tetrahedron* **1985**, *41*, 3339.

produits constituent des produits d'une grande importance dans l'investigation des structures secondaires et tertiaires des protéines¹³⁷.

Nous avons utilisé l'enzyme *Lipase de Candida antarctica B* pour ces réactions puisqu'elle est apparue au cours du criblage comme l'enzyme le plus performant parmi ceux testés. Deux expériences ont été réalisées en présence de 3 équivalents d'eau lourde ou de H₂¹⁸O. Les résultats sont résumés dans le schéma 74.

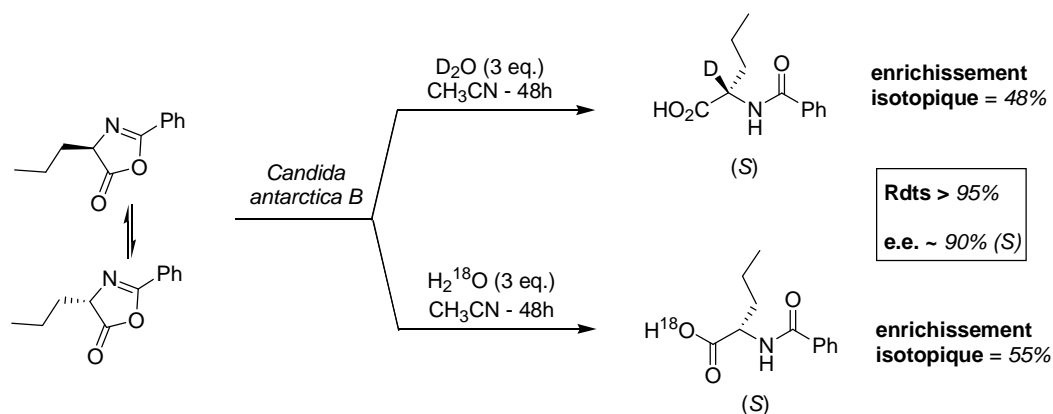


Schéma 74. Préparation des acides aminés *N*-benzoylés marqués au deutérium ou à l'oxygène 18.

Comme attendu, les acides aminés marqués ont bien été obtenus, cependant nous pouvons noter que les enrichissements isotopiques sont bien plus faibles que ceux des matières premières : respectivement 99% pour D₂O et 94% pour H₂¹⁸O. Ceci s'explique très probablement par la présence de traces d'eau soit dans l'acétonitrile distillé soit dans les poudres d'enzymes utilisées.

¹³⁷ I. Sack, Y.S. Balazs, S. Rahimipour, S. Vega, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 12263.

Chapitre 4. Criblage de réactions de couplage par dosage « sandwich »

I. Art antérieur et résultats du laboratoire

I.1. Techniques de criblage de réactions de couplage décrites dans la littérature.

Les réactions de couplage entre deux fonctions permettant la formation de liens C-C, C-O ou encore C-N font partie des fondements de la synthèse organique et continuent d'attirer l'intérêt des chercheurs. Les approches alliant chimie combinatoire et criblage à haut débit ont également été utilisées pour la découverte et l'optimisation de nouveaux systèmes catalytiques efficaces pour ce type de réaction. Parmi les différentes techniques de criblage mises au point au cours des dix dernières années,¹³⁸ les techniques basées sur le transfert¹³⁹ ou le quenching de fluorescence de substrats étiquetés sont celles les plus décrites dans la littérature.

A titre d'exemple, l'équipe de J. F. Hartwig de l'université de Yale a pu mettre en évidence par criblage rapide un nouveau système palladique particulièrement efficace pour réaliser la réaction de Heck à température ambiante (figure 48).¹⁴⁰

¹³⁸ a) O. Löber, M. Kawatsura, J.F. Hartwig, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4366; b) O. Lavastre, J.P. Morken, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 3163; c) V.P.W. Böhm, W.A. Herrman, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 3679;

¹³⁹ a) K.H. Shaughnessy, P. Kim, J.F. Hartwig, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2123; b) F. Tanaka, R. Thayumanavan, C.F. Barbas, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8523.

¹⁴⁰ J.P. Stambuli, S.R. Stauffer, K.H. Shaughnessy, J.F. Hartwig, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2677.

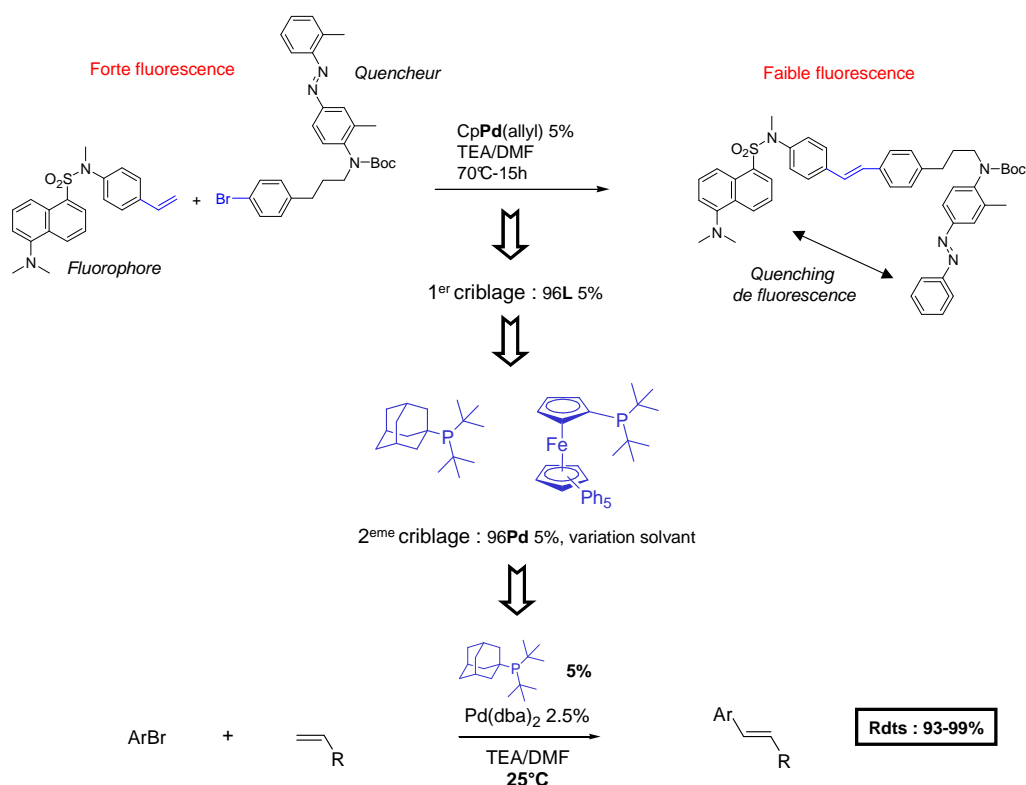


Figure 48. Criblage d'une banque de catalyseurs pour la réaction de Heck à température ambiante.

Le principe de la technique de criblage est basé sur l'utilisation de substrats étiquetés par un fluorophore et par une étiquette capable de quencher la fluorescence. Suite à l'acte catalytique, ces deux étiquettes se trouvent présentes sur le produit de couplage, le quencheur induit donc une diminution du signal fluorescent initial. Ce type de criblage a également été utilisé avec succès pour d'autres réactions de couplage.¹⁴¹

Outre la simplicité du protocole de criblage (simple lecture de fluorescence), le principal avantage de cette technique réside dans la possibilité d'établir facilement une cinétique de la réaction. En revanche, de faux positifs sont souvent observés car certains systèmes organométalliques sont également de bons quenchers de fluorescence.

Une autre méthode remarquable par sa simplicité d'exécution et son faible coût de mise en place utilise l'analyse d'image de chromatographie sur couche mince de bruts réactionnels.¹⁴² Cette méthode a été appliquée avec succès à la réaction de Sonogashira (figure 49).

¹⁴¹ S.R Stauffer, N.A. Beare, J.P. Stambuli, J.F. Hartwig, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 4641.

¹⁴² S. Garbacia, R. Touzani, O. Lavastre, *J. Comb. Chem.* **2004**, 6, 297.

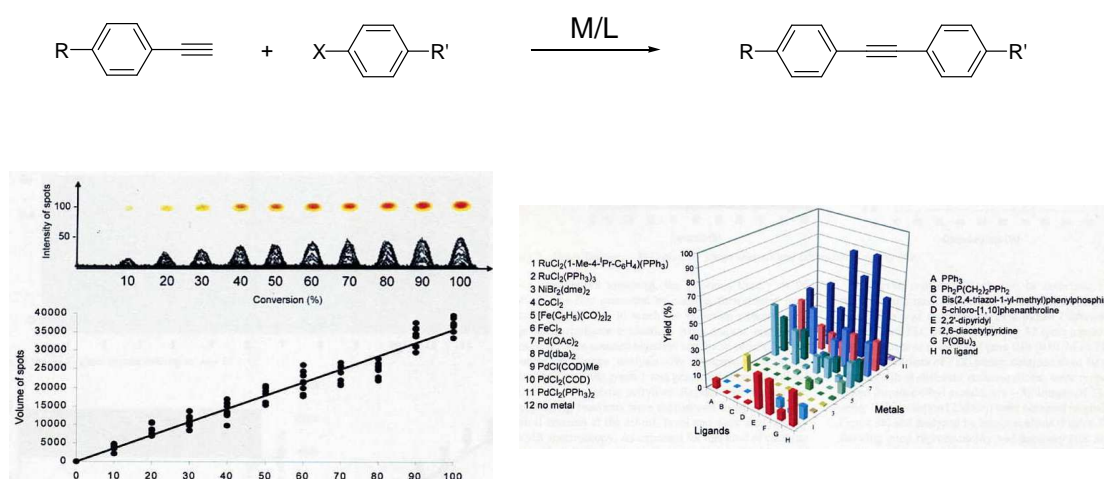


Figure 49. Criblage de catalyseurs pour la réaction de Sonogashira par analyse d'image de chromatographie en couche mince.

Cette méthode utilise du matériel très peu onéreux et permet une analyse qualitative et quantitative des taches obtenues en CCM. Ainsi, un volume connu du brut réactionnel (échantillon) est déposé sur une plaque CCM et élué. Après migration, l'image de la plaque est numérisée à l'aide d'un appareil photo numérique ou un scanner et l'image analysée par un logiciel dédié. L'intensité des taches permet d'accéder facilement à la valeur du rendement de la réaction (cf. figure 49).

I.2. Résultats du laboratoire

Depuis quelques années notre laboratoire a développé une nouvelle technique immunologique permettant le criblage à haut débit des réactions de couplage¹⁴³.

Cette technique immunoanalytique connue sous le nom de « sandwich » est très utilisée dans le domaine du diagnostic pour le dosage d'antigènes tels que les protéines, les virus ou les bactéries ainsi que d'autres macromolécules. Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, elle utilise, typiquement, deux anticorps monoclonaux : le premier réalise la capture de l'antigène sur la phase solide et le deuxième est utilisé comme traceur. Pour pouvoir utiliser un tel test il est donc nécessaire de disposer de deux anticorps complémentaires de deux régions différentes, appelées épitopes, de la macromolécule. L'addition de ces deux anticorps sur la macromolécule se traduit par la formation d'un complexe ternaire pouvant être détecté grâce à l'anticorps marqué par une enzyme par exemple. Dans ce cas, et contrairement au dosage par compétition

¹⁴³ P. Vicennati, N. Bensel, A. Wagner, C. Créminon, F. Taran, *Angew. Chem. Intl. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 6863.

décrit dans le chapitre précédent, la concentration en antigène est directement proportionnelle à la densité optique mesurée en fin de processus.

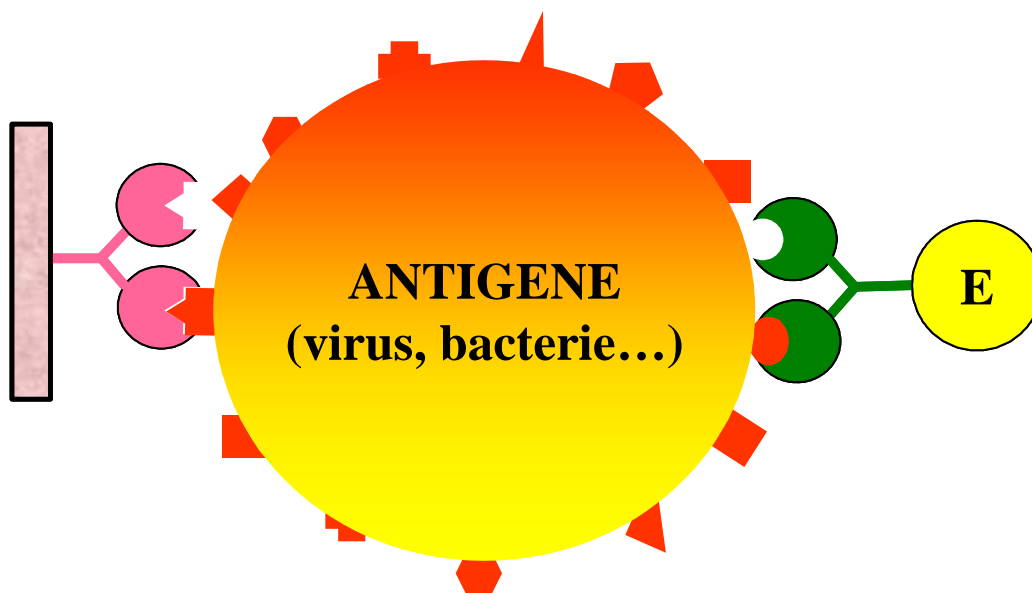


Figure 50. Principe du test « sandwich » appliqué à la détection d'antigènes de haut poids moléculaire.

Notre laboratoire a démontré qu'il était possible d'adapter ce type de test immunométrique à la détection de petites molécules portant des épitopes (ici des « étiquettes chimiques ») contre lesquelles deux anticorps monoclonaux spécifiques ont été produits.

En pratique, afin qu'un criblage de catalyseur puisse être mis en place à l'aide de ce type de test, plusieurs étapes doivent être réalisées (figure 51). La catalyse, qui doit conduire au produit « doublement étiqueté » est effectuée dans des plaques de microtitration 96 puits puis, le mélange réactionnel brut est transféré après dilution dans une plaque sur laquelle l'anticorps de capture a été préalablement fixé. Après que la capture ait été réalisée, les puits sont lavés avec une solution de tampon phosphate (10 mM contenant 0,05% Tween 20) pour que toute espèce ne portant pas l'étiquette « de capture », **A**, soit enlevée. Ensuite, un second anticorps, spécifique de l'étiquette **B**, marqué par une enzyme est additionné au milieu. Après un nouveau lavage, seulement les espèces portant les deux étiquettes sont détectées. Comme dans les chapitres précédents, l'enzyme utilisée est l'acétylcholine estérase dont l'activité est détectée après addition d'acétylthiocholine et de DTNB (voir chapitre 1) ; une lecture de densité optique (λ_{\max} 414 nm) permet ensuite de déterminer la concentration en produit doublement étiqueté, reflet de l'efficacité du catalyseur testé.

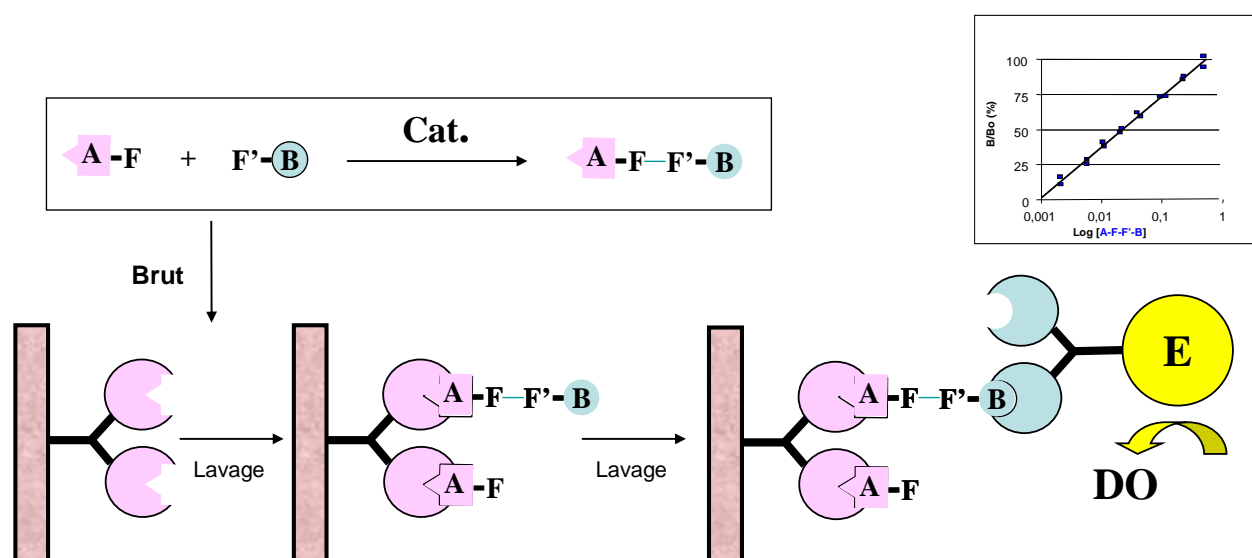


Figure 51. Principe du test sandwich adapté au criblage des réactions de couplage. A et B sont les étiquettes des fonctions chimiques F et F' respectivement

Afin de valider le concept de ce criblage, celui-ci a été adapté pour la réaction de couplage de Sonogashira entre un composé aromatique halogéné et un alcyne catalysée par le palladium. Deux substrats ont été synthétisés portant des étiquettes contre lesquelles des anticorps monoclonaux spécifiques avaient été produits auparavant¹⁴⁴. Ces deux étiquettes sont des molécules comportant un motif imidazole (étiquette A) et un motif guaiacol (étiquette B) respectivement.

¹⁴⁴ F. Taran, Y. Frobert, C. Créminon, J. Grassi, D. Olichon, C. Mioskowski, P. Pradelles, *Clin. Chem.* **1997**, 43, 363.

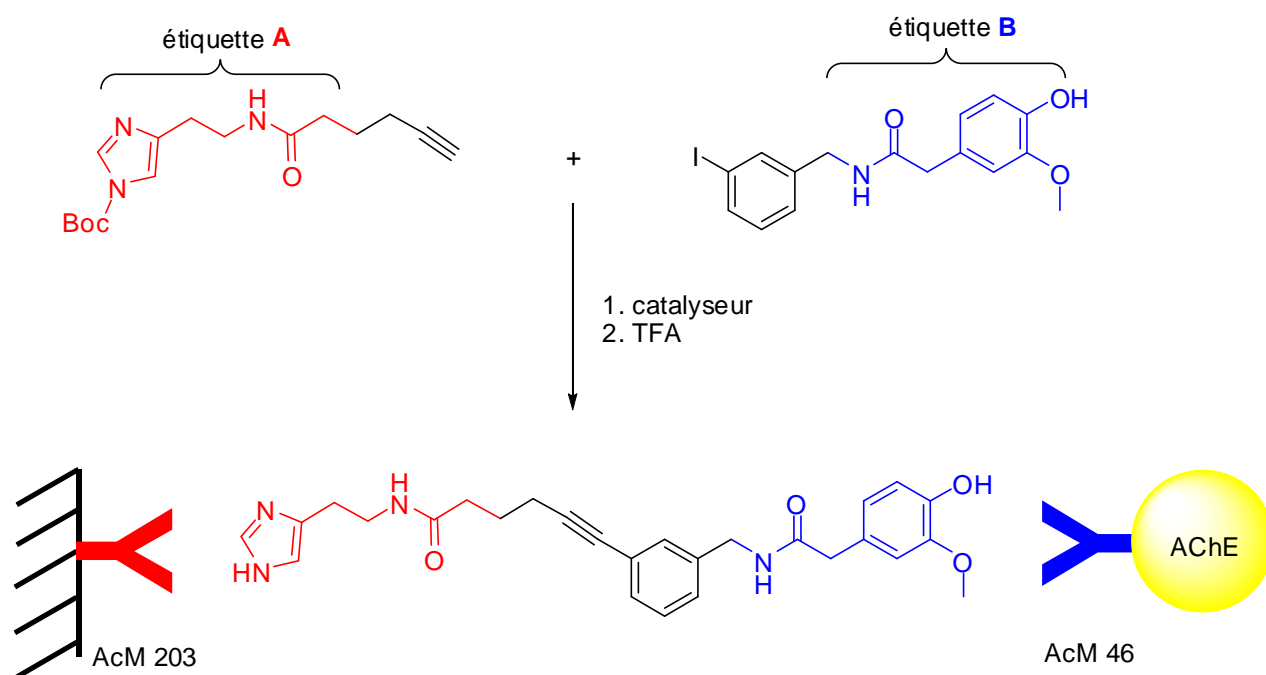


Figure 52. Réaction de Sonogashira criblée à l'aide du dosage sandwich

Les anticorps choisis ont été l'AcM 203 (anti-histamine) et l'AcM 46 (anti-guaiacol) car ils ont produit les meilleurs résultats pour la capture/détection.

Le test utilisant ces deux anticorps peut détecter le produit de couplage à des concentrations extrêmement basses (10 nM), la limite de détection se situant à approximativement 0,5 nM.

Le criblage de nombreuses conditions catalytiques a permis l'identification et l'optimisation d'un système catalytique hétérogène (figure 53, en rouge) capable de fournir des rendements supérieurs à 80% pour cette réaction de couplage.

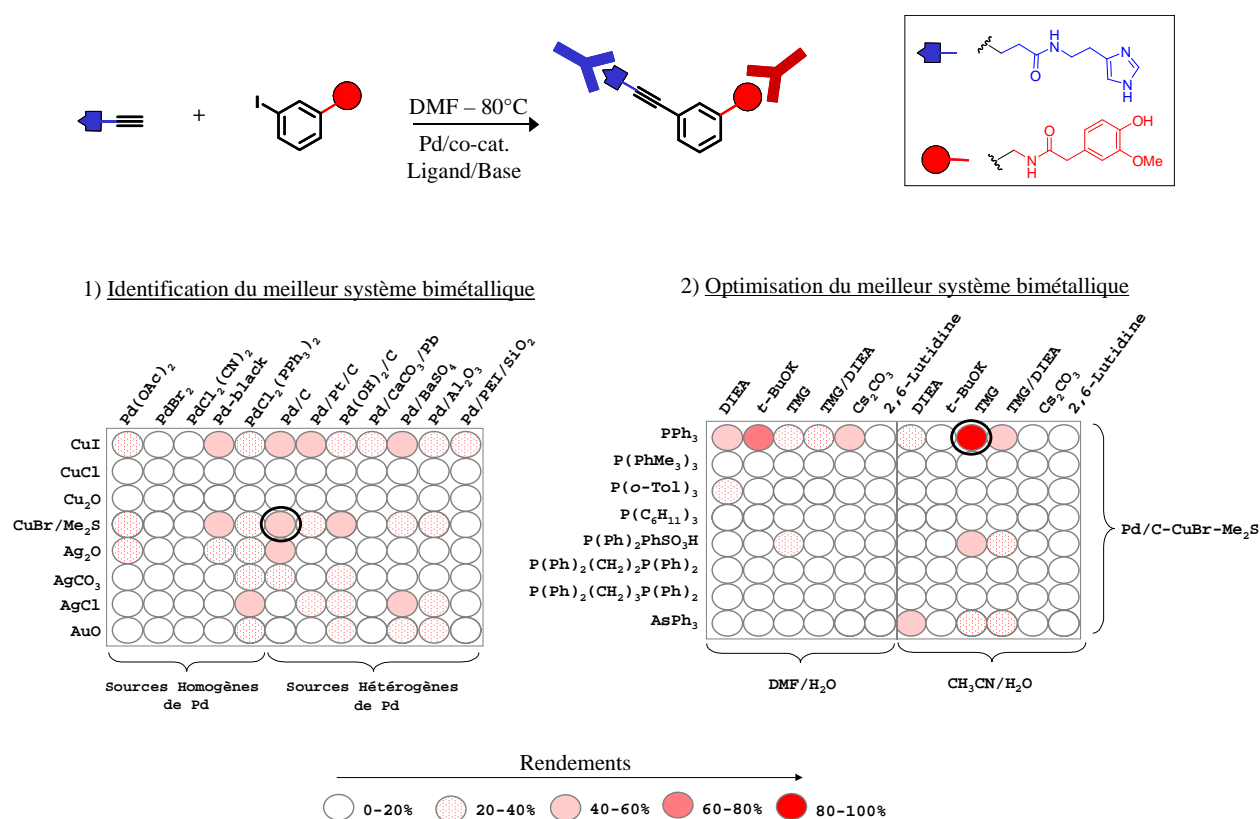


Figure 53. Criblage de catalyseurs pour la réaction de couplage de Sonogashira.

Cette méthode a par la suite été validée en établissant une corrélation avec des valeurs obtenues par CLHP. Celle-ci s'est avérée excellente ($r^2 \sim 0,95$). Les meilleurs systèmes catalytiques ont été également utilisés avec succès sur une variété de substrats.

Outre sa simplicité de mise en œuvre et sa rapidité d'exécution, cette méthode de criblage est générale puisqu'elle permet d'étudier toute réaction de couplage quelle qu'elle soit.

II. Objectifs. Nouvelle réaction cible

Nous avons souhaité tirer profit de la sensibilité très élevée de la technique sandwich pour le criblage à haut débit de catalyseurs à base de cuivre (I) capables d'accélérer la réaction de cycloaddition alcyne-azoture.

Cette cycloaddition fait partie de la série de réactions appelée par K.B. Sharpless « click chemistry ». Ce sont des réactions qui sont modulaires, spécifiques, produisant un rendement important et qui utilisent des techniques expérimentales simples. Elles doivent utiliser comme produits de départ des composés facilement accessibles, doivent être respectueuses de

l'environnement (sans solvant ou utilisant l'eau comme solvant) et doivent, si possible, éviter l'emploi des techniques chromatographiques pour l'isolement du produit de la réaction¹⁴⁵. Peu de réactions sont capables de répondre à ce cahier de charges : l'ouverture des cycles tendus (époxydes, aziridines)¹⁴⁶, la formation d'époxydes à partir d'oléfine et d'oxygène¹⁴⁷, et les cycloadditions 1,3-dipolaires¹⁴⁸ et Diels-Alder¹⁴⁹.

La réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire des alcynes et azotures, appelée aussi la cycloaddition de Huisgen¹⁵⁰, produit thermiquement deux régioisomères ce qui la rend relativement peu intéressante d'un point de vue synthétique.

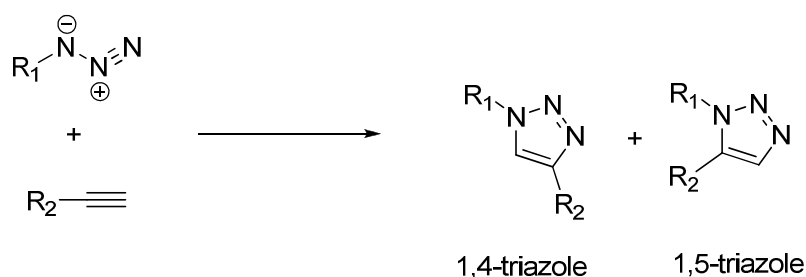


Schéma 75. Produits de la réaction thermique de Huisgen (deux régioisomères)

La découverte que le cuivre (I) puisse catalyser cette transformation¹⁵¹ a permis de rendre cette transformation très performante et répondant au cahier de charges d'une réaction de type « click chemistry » car la réaction catalysée est régiospécifique, c'est-à-dire ne formant que le régioisomère 1,4-triazole. De plus, la vitesse de la réaction peut être accélérée par des sels de cuivre (I) par un facteur de jusqu'à 10 millions¹⁵².

L'intérêt pour cette transformation est très grand actuellement¹⁵³ car les produits de départ sont stables et inertes dans la plupart des conditions biologiques et organiques, y compris en présence de molécules biologiques hautement fonctionnalisées, ainsi que dans la majorité des conditions réactionnelles utilisées en synthèse organique¹⁵⁴.

¹⁴⁵ a) H.C. Kolb, M.G. Finn, K.B. Sharpless, *Angew. Chem. Intl. Ed. Engl.* **2001**, 40, 2004; b) H. C. Kolb, K.B. Sharpless, *Drug Discov. Today* **2003**, 8, 1128.

¹⁴⁶ I.M. Pastor, M. Yus, *Curr. Org. Chem.* **2005**, 9, 1.

¹⁴⁷ T. Siu, A.K. Yudin, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 530.

¹⁴⁸ J.G. Fernández-Bolaños in *Carbohydrates in Heterocyclic Chemistry*, in *Topics in Heterocyclic Chemistry*, ed. E.S.H. El Ashry, Springer, Berlin, **2007**.

¹⁴⁹ B. Gacal, H. Durmaz, M.A. Tasdelen, G. Hizal, U. Tunca, Y. Yagci, A.L. Demirel, *Macromolecules* **2006**, 39, 5330.

¹⁵⁰ R. Huisgen in *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*, ed. A. Padwa, Wiley, New York, **1984**.

¹⁵¹ a) V.V. Rostovtsev, L.G. Green, V.V. Fokin, K.B. Sharpless, *Angew. Chem. Intl. Ed. Engl.* **2002**, 41, 2596; b) C.W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057.

¹⁵² P. Appunkuttan, W. Dehaen, V.V. Fokin, E. van der Eycken, *Org. Lett.* **2004**, 6, 4223.

¹⁵³ 732 citations pour l'article de K.B. Sharpless sur la catalyse par le cuivre (I) de la réaction de cycloaddition, début 2008.

¹⁵⁴ V.D. Bock, H. Hiemstra, J.H. van Maarseveen, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 51.

Depuis la découverte de la catalyse au cuivre, des nombreux articles dans la littérature étudient les conditions opératoires pour cette transformation. Au début, pour la majorité des conditions décrites, l'iodure de cuivre (I) était utilisé^{147b}, puis des méthodes faisant appel à la réduction in situ du sulfate de cuivre sont apparues^{147a} ainsi que des procédures qui utilisent la comproportionation du cuivre métallique avec des sels de cuivre (II) pour générer le une espèce de cuivre (I) active¹⁵⁵. Le mécanisme de cette transformation n'est pas bien établi et seulement des propositions issues de quelques études cinétiques sont disponibles¹⁵⁶.

Une application intéressante de cette réaction est son application en bioconjugaison¹⁵⁷. En effet, la grande chimiosélectivité de cette réaction de couplage ainsi que son efficacité en milieu aqueux sont particulièrement intéressants dans l'optique de coupler deux macromolécules par exemple. Il est relativement simple d'introduire sur des biomolécules des fonctions azotures ou des fonctions alcynes à l'aide de réactions classiques telles que le couplage peptidique et en utilisant un large excès de réactifs. Ces biomolécules peuvent être alors couplées l'une à l'autre si la réaction de cycloaddition possède une cinétique élevée. Ce dernier point est crucial et reste encore aujourd'hui une limite à l'utilisation de cette réaction en bioconjugaison. Les macromolécules (protéines, polymères) sont par définition des entités de haut poids moléculaire. Le couplage covalent de deux entités de cette nature implique donc forcément des conditions de haute dilution (à titre d'exemple une protéine d'un poids moléculaire de 100.000 à concentration de 0,1 mg/mL correspond à une concentration de 10^{-6} M).

Des recherches ont donc été entreprises dans plusieurs groupes pour tenter d'améliorer la cinétique de cette réaction de cyclisation catalysée par le cuivre (I). Les efforts de recherche ont porté sur l'augmentation des capacités catalytiques du cuivre (I) par complexation avec des ligands appropriés. La contribution la plus significative dans ce domaine correspond à un travail décrit par l'équipe de M.G. Finn en 2004. Une banque de ligands du cuivre a ainsi été criblée à l'aide d'une méthode¹⁵⁸ basée sur le quenching de fluorescence accompagnant la réaction afin de mesurer la cinétique de la réaction en présence de différents systèmes organométalliques testés (figure 54).

¹⁵⁵ a) Q. Wang, T.R. Chan, R. Hilgraf, V.V. Fokin, K.B. Sharpless, M.G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3192; b) F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V.V. Rostovtsev, L. Noodleman, K.B. Sharpless, V.V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 210.

¹⁵⁶ V.O. Rodionov, V.V. Fokin, M.G. Finn, *Angew. Chem. Intl. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 2210.

¹⁵⁷ a) S.S. Gupta, J. Kuzelka, P. Singh, W.G. Lewis, M. Manchester, M.G. Finn, *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 1572; b) A.J. Dirks, S.S. van Berkel, N.S. Hatzakis, J.A. Opsteen, F.L. van Delft, J.J.L.M. Cornelissen, A.E. Rowan, J.C.M. van Hest, F.P.J.T. Rutjes, R.J.M. Nolte, *Chem. Comm.* **2005**, 4172.

¹⁵⁸ W.G. Lewis, F.G. Magallon, V.V. Fokin, M.G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9152.

Les deux réactifs utilisés sont fluorescents, tandis que le produit de réaction, le triazole, est très peu fluorescent. La moitié inférieure de la plaque représente la même expérience effectuée en absence d'alcyne, mais en présence de son homologue totalement saturé (alkyl) et sert comme témoin négatif afin de contrôler l'apparition éventuelle de faux positifs.

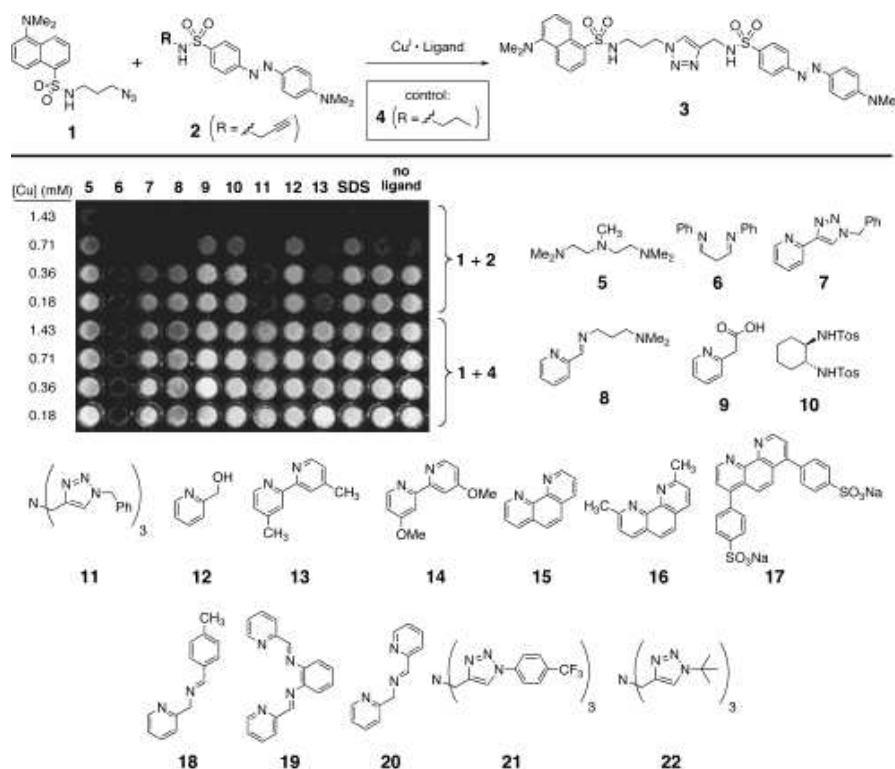


Figure 54. Criblage de 18 ligands du cuivre (I) pour la réaction de Huisgen

La catalyse est effectuée à des concentrations de 31 μ M en alcyne et azoture, 77 μ M en ligand dans un mélange DMSO/tampon TRIS 38/62. Quatre concentrations en cuivre ont aussi été testées : 0,16, 0,36, 0,71 et 1,43 mM. Il ne s'agit donc pas de concentrations catalytiques en cuivre. Ces concentrations en cuivre élevées sont en fait nécessaires à l'avancement de la réaction dans ces conditions de concentration relativement faible en substrat.

Ce criblage a mis en évidence l'importance du phénomène de catalyse accélérée par le ligand¹⁵⁹ pour cette transformation chimique.

Le meilleur ligand pour le cuivre trouvé à l'issue de ce criblage est le sel disodique de la bathophénanthroline (figure 54, ligand 17), qui permet une accélération notable de la cinétique et qui présente l'avantage d'avoir une excellente solubilité dans l'eau.

¹⁵⁹ D.J. Berrisford, C. Bolm, K.B. Sharpless, *Angew. Chem. Intl. Ed. Engl.* **1995**, 34, 1059.

Comme les auteurs le décrivent, l'inconvénient de ce test est la possible interférence du fluorophore avec certains ligands comme on peut l'observer dans la figure 54 dans le cas du ligand 6. De même, ce test ne permet pas de réaliser le criblage de plusieurs agents réducteurs, ceux-ci étant susceptibles de réagir avec le groupement diazo du quencher.

Afin de pallier aux inconvénients présentés par la méthode de criblage de M.G. Finn, nous avons voulu adapter notre test immunologique pour le criblage à haut débit des catalyseurs à base de cuivre pour la réaction de cycloaddition alcyne-azoture.

Ce test présente aussi un autre avantage : sa grande sensibilité ce qui le recommande pour le criblage des catalyseurs pour des réactions effectuées à haute dilution.

III. Résultats

Nous avons entrepris dans un premier temps la synthèse des produits de départ alcyne et azoture devant posséder une étiquette contre laquelle nous disposons d'anticorps spécifiques. Il est également nécessaire de préparer le produit de couplage triazole afin d'établir une gamme étalon.

III.1. Synthèse des substrats et du produit de couplage

Nous avons utilisé comme substrats des produits étiquetés de la même manière que pour le test de criblage pour la réaction de Sonogashira présentée précédemment. Leur synthèse est aisée, comme le montre le schéma qui suit.

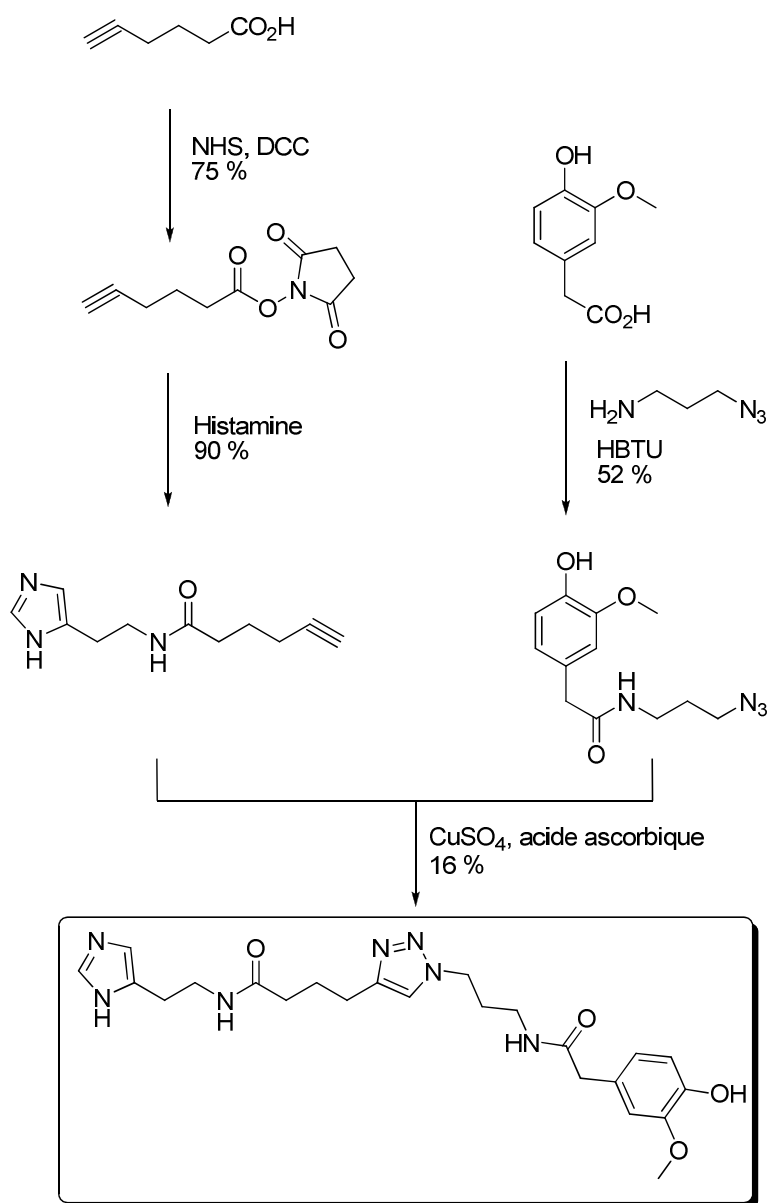
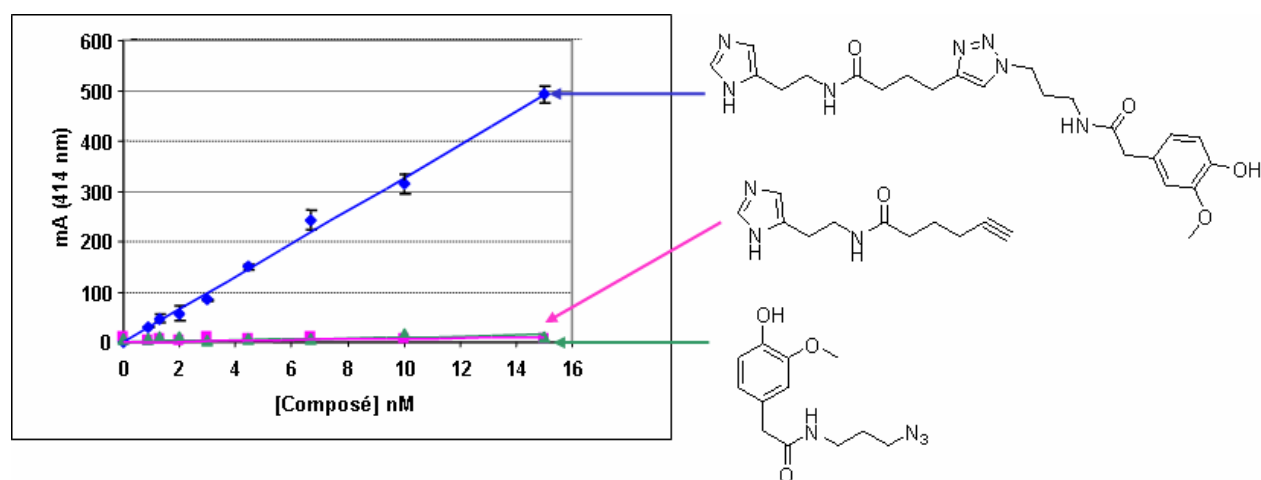


Schéma 76. Synthèse des substrats alcyne et azoture et du produit triazole

Cette synthèse part de produits commerciaux, comme l'acide homovanillique et l'acide hexynoïque qui sont transformés par des réactions simples de couplage peptidique pour conduire aux deux partenaires alcyne et azoture présentés précédemment. Un échantillon analytique du produit de cycloaddition est obtenu par la catalyse au sulfate de cuivre (II) réduit *in situ* par l'acide ascorbique.

III.2. Mise au point de la méthode de criblage

Disposant des substrats étiquetés et du produit de couplage triazole, nous avons alors confirmé que le test sandwich pouvait être opérationnel pour le suivi de cette réaction. La figure 55 montre que le produit de réaction triazole peut être détecté de façon spécifique et sensible par l'utilisation de deux anticorps spécifiques des étiquettes.



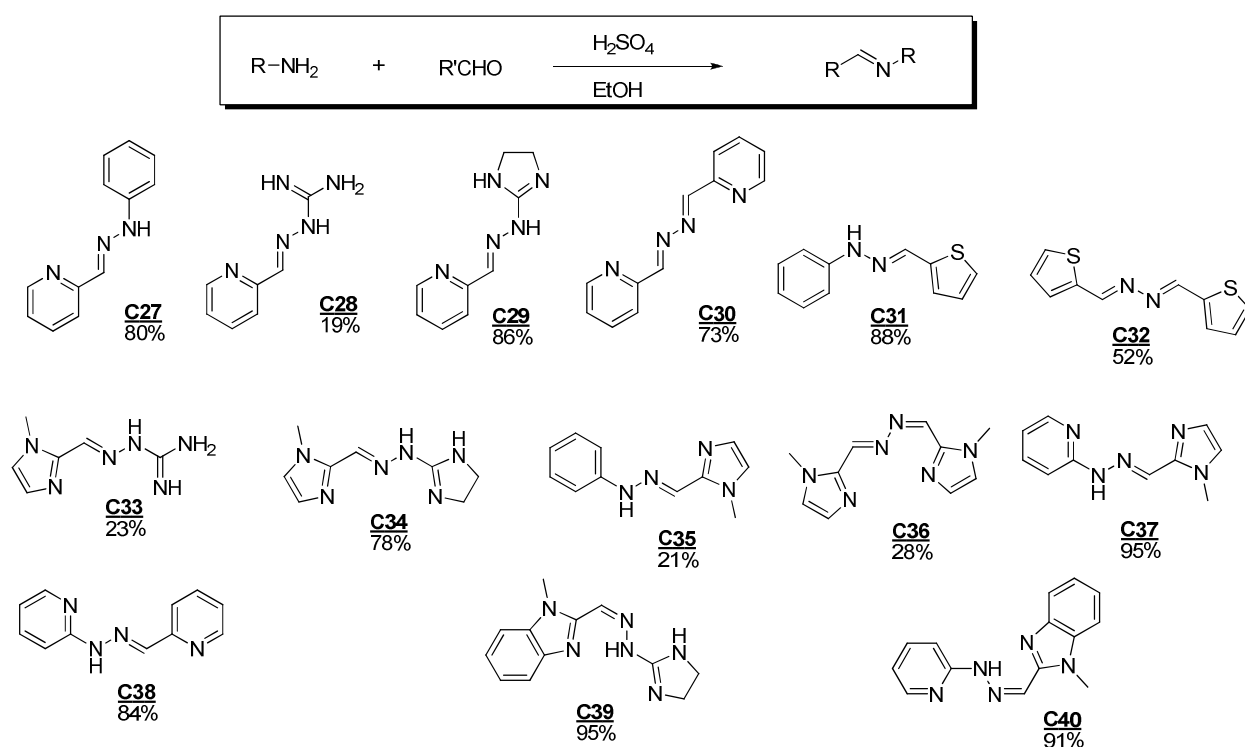
La sensibilité du dosage est comparable à celle observée dans le cas de la réaction de Sonogashira et nous permet de suivre le déroulement de cette réaction dans des conditions de haute dilution pouvant aller jusqu'à 10^{-8} M.

III.3. Synthèse d'une banque de ligands du cuivre (I)

Le ligand « idéal » pour cette réaction, au moins en théorie, doit remplir les conditions d'un cahier de charges exigeant : il doit, en premier lieu, former un complexe de cuivre très actif et, si possible, maintenir l'état d'oxydation +1 du métal, et enfin doit protéger les entités biologiques présentes dans le milieu (protéines, polynucléotides) en séquestrant le cuivre¹⁶⁰. La solubilité dans l'eau est aussi une qualité indispensable pour une application de bioconjugaison.

¹⁶⁰ S.S. Gupta, J. Kuzelka, P. Singh, W.G. Lewis, M. Manchester, M.G. Finn, *Bioconjugate Chem.*, **2005**, 16, 1572.

Une première série de 15 ligands a pu être facilement obtenue par formation de base de Schiff sous catalyse acide entre un certain nombre d'aldéhydes et d'amines porteurs de fonctions azotés. Les aldazines **C30**, **C32**, **C34** et **C36** ont été obtenues par condensation de deux équivalents aldéhydes sur l'hydrazine. La préparation de ces composés, obtenus avec des rendements variables, a été facilitée en raison de leur précipitation dans le milieu réactionnel.



Un composé de type bis-imidazole a été également préparé selon un procédé décrit dans la littérature¹⁶² (schéma 78).

¹⁶² S.B. Park, H. Alper, *Org. Lett.* **2003**, 5, 3209.

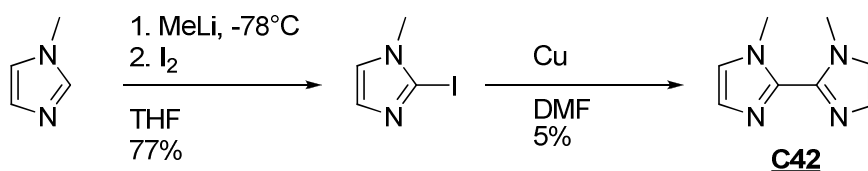


Schéma 78. Préparation du ligand bis(imidazole)

Une famille de ligands dithiocarbamate / bis(dithiocarbamate) a été aussi synthétisée pour être évaluée dans le cadre du même criblage.

Ces ligands soufrés ont été synthétisés selon la procédure de E.A. Castro¹⁶³, en faisant réagir les amines correspondantes avec le disulfure de carbone dans l'éthanol comme solvant, en présence de KOH.

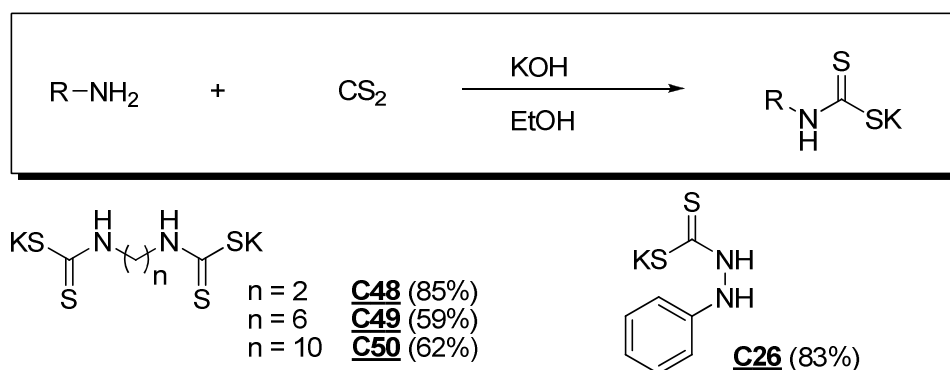


Schéma 79. Synthèse des dithiocarbamates

III.4. Criblage à haut débit des catalyseurs

Ayant rassemblé une banque de 50 ligands du cuivre et susceptibles d'accélérer cette réaction de cycloaddition (schéma 80), nous avons décidé d'effectuer le criblage de ces catalyseurs à des différents pH et différents rapports catalyseur/ligand.

Les catalyses sont effectuées à une concentration en substrat de 1 mM et en sulfate de cuivre (II) de 100 μ M (10%). 100 équivalents d'acide ascorbique sont additionnés dans un milieu *tert*-butanol/eau 1 : 1 pour assurer la réduction totale du cuivre (II) en cuivre (I) lors de la réaction.

Une expérience en absence de ligand a été aussi effectuée, pour pouvoir quantifier le phénomène de catalyse accélérée par le ligand.

¹⁶³ E.A. Castro, S.A. Peña, J.G. Santos, J.C. Vega, *J. Org. Chem.* **1984**, 49, 863.

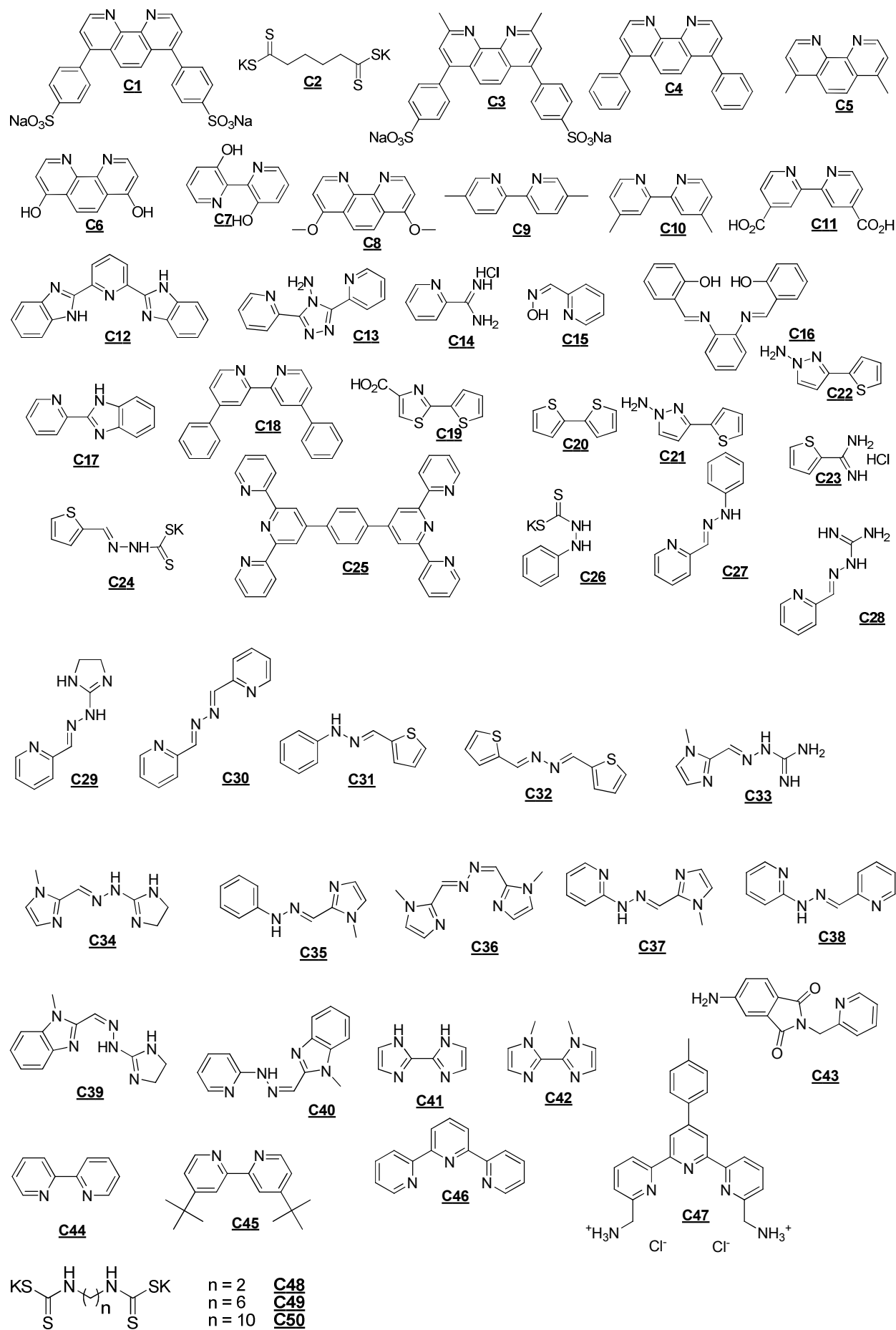
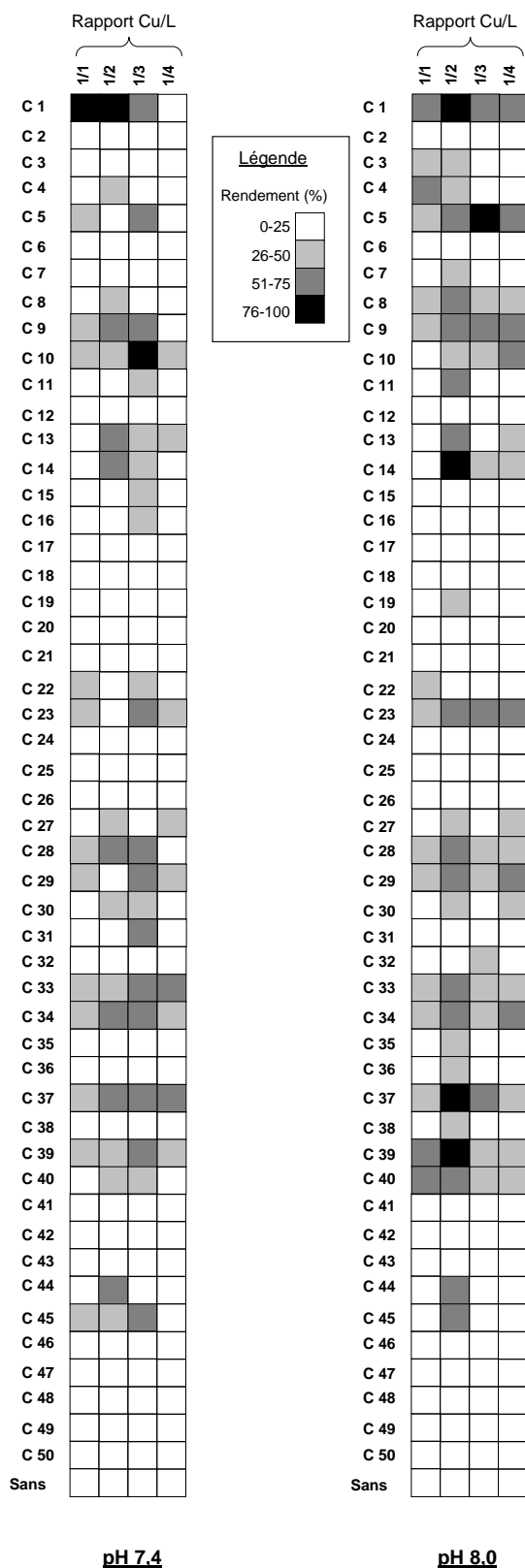


Schéma 80. Ligands utilisés pour le criblage des catalyseurs à base de cuivre (I)



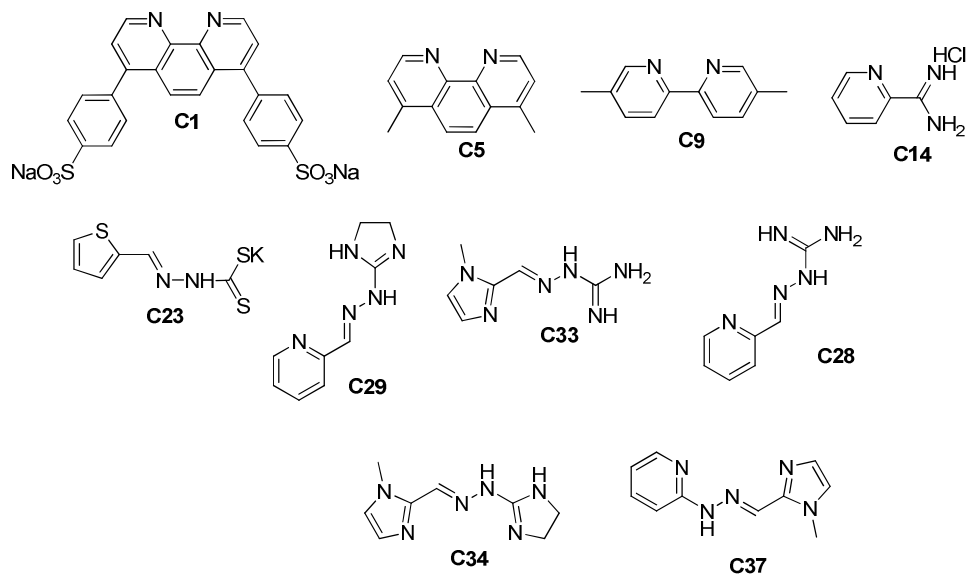
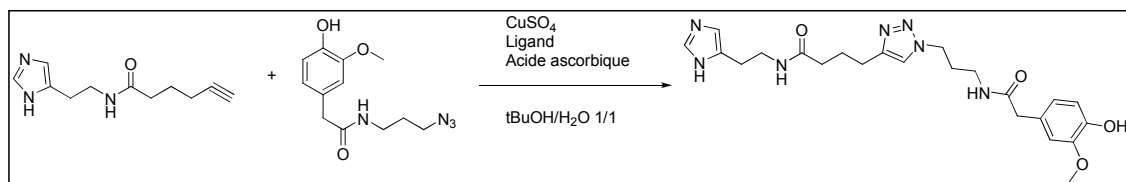
158

Les résultats illustrés dans la figure 56 montrent qu'en absence de ligand, pratiquement aucune formation en produit de couplage n'est observée dans les conditions réactionnelles utilisées dans cette expérience. De même aucun ligand soufré ne permet d'accélérer cette réaction de façon notable. En revanche, un certain nombre de ligands azotés dont certaines phénanthrolines mais aussi des ligands possédant un motif guanidine semblent donner des résultats encourageants.

On peut de même observer que généralement c'est le rapport cuivre/ligand 1/2 qui fournit les meilleurs résultats et, en terme de pH, les réactions effectuées à pH 8,0 semblent donner des meilleurs taux de conversion.

Etant donné le fait que le criblage a été effectué à une concentration en substrat de 1mM, nous avons voulu savoir si les meilleurs systèmes catalytiques étaient capables de catalyser cette même réaction mais cette fois-ci effectuée à une concentration beaucoup plus faible, c'est à dire à 10 μ M en substrat. 100 équivalents de cuivre (I) ont été dans ce cas utilisés (1 mM).

Les ligands sélectionnés pour ce criblage sont les ligands qui ont fourni les meilleures performances lors du premier criblage, c'est-à-dire **C1**, **C5**, **C14** et **C37** ainsi que 6 autres ligands qui ont fourni des résultats légèrement inférieurs (**C9**, **C23**, **C28**, **C29**, **C33**, **C34**). Malheureusement le lot de ligand **C39** étant épuisé, nous n'avons pu le tester.



C 1		
C 5		
C 9		
C 14		
C 23		
C 28		
C 29		
C 33		
C 34		
C 37		
	pH 7,4	pH 8,0

Légende	
Rendement (%)	
0-10	
10-20	
21-30	
31-40	
41-50	

Figure 57. Réaction test pour le criblage. *Conditions* : 10 μM en substrat, 10 mM CuSO_4 , ligand 20 mM, 100 mM acide ascorbique, *tert*-butanol/ H_2O 1/1, volume total 200 μL , 25°C-72h.

Ces résultats confirment que parmi les ligands préparés par nos soins les ligands **C37** et **C28** forment des complexes a priori plus efficaces que celui obtenu avec la bathophénanthroline **C1** décrit par M.G. Finn. Ces ligands permettent en effet de faire fonctionner cette réaction à 10 μM en substrat. Cependant, des larges excès de cuivre sont nécessaires (100 équivalents) et le taux de conversion n'est pas total même après trois jours de réaction. Il sera donc nécessaire d'optimiser ce système afin de le rendre intéressant pour des applications en bioconjugaison.

Conclusion générale

L'objectif principal de ce travail de thèse était de démontrer que les techniques immuno-analytiques, bien connues dans le monde du diagnostic, pouvaient être appliquées efficacement au criblage des catalyseurs chimiques et biologiques.

Cet objectif a été atteint puisque dans les deux types de projet, décrits dans ce travail, à savoir le criblage de catalyseurs asymétriques et le criblage de catalyseurs pour les réactions de couplage, les outils immunologiques que nous avons développés se sont avérés précieux et nous ont permis d'accélérer le processus de découverte et d'optimisation de catalyseurs.

Dans le chapitre 2 spécialement, est présente le criblage de systèmes catalytiques pour deux réactions énantiosélectives à l'aide d'un test par compétition utilisant des anticorps monoclonaux énantiosélectifs. Pour la réaction d'insertion énantiosélective des carbénoïdes dans la liaison OH de l'eau, 840 systèmes ont été testés, ce qui a conduit à la découverte d'un complexe cuivre – semicorrine catalysant la réaction avec un rendement de 42% et un excès énantiomérique de 85% en faveur de l'énantiomère (*S*) ce qui représentait à l'époque où les travaux ont été effectués les meilleurs résultats pour cette transformation¹⁶⁴. Nos essais d'amélioration du rendement et de l'excès de cette transformation, malheureusement n'ont pas fourni les résultats escomptés. En ce qui concerne la réaction de réduction asymétrique des α -cétoesters, 216 expériences ont été conduites ce qui nous a permis de mettre au jour quelques systèmes catalytiques fournissant l'accès aux deux énantiomères du produit de cette réaction. Les excès énantiomériques sont de l'ordre de 90%, par contre les rendements sont à améliorer. Un système organométallique en particulier s'est avéré plus efficace en termes de *ee* que le meilleur système décrit pour cette réaction asymétrique. Bien sûr, un travail expérimental doit être entrepris pour compléter cette étude.

Nous avons également pu démontrer dans le chapitre 3 qu'il était possible de développer ce test de criblage à moindre coût en utilisant des anticorps polyclonaux énantiospécifiques. Ces derniers ont été obtenus suite à une immunisation en utilisant des composés énantio-purs. Nous avons aussi montré que ce test pouvait être appliqué à une famille entière de produits, sans que des interférences significatives se produisent. Afin de démontrer le concept, nous l'avons utilisé

¹⁶⁴ En 2007 le meilleur système décrit dans la littérature fournissait 55% de rendement et seulement 15% de *ee* pour cette transformation.

pour le criblage de biocatalyseurs pour la réaction d'ouverture énantiosélective des oxazolones. Cette étude a permis d'établir rapidement un profil de spécificité d'une dizaine de biocatalyseurs.

Enfin, le dernier chapitre présente une méthode immunométrique communément appelée « sandwich » et ses applications pour le criblage de catalyseurs pour les réactions de couplage. Dans le cadre de ce travail, le criblage de 400 conditions expérimentales différentes nous avons découvert un ligand du cuivre performant pour la réaction de cycloaddition alcyne-azoture de Huisgen. Ce ligand est plus performant que le ligand de référence utilisé en bioconjugaison (le sel disodique de la bathophénanthroline) dans des conditions difficiles de catalyse, à très faible concentration en substrat (10 μ M).

En réalisant ce travail de thèse nous avons montré que les méthodes immunoenzymatiques sont des méthodes de choix pour le criblage et la découverte de nouveaux catalyseurs.

De façon plus globale, les trois études présentées dans ce travail de thèse, montrent qu'il est possible d'obtenir dans une période relativement courte des systèmes catalytiques rivalisant avec les meilleurs décrits dans la littérature. Une étape supérieure dans cette recherche consisterait à appliquer cette stratégie sur une banque plus étendue de catalyseurs potentiels de manière à augmenter la probabilité de découvrir des systèmes encore plus performants. Certaines limites de ce type d'approche sont toutefois à mentionner. En effet, les expériences de catalyse menées en grand nombre nécessitent des procédures expérimentales simplifiées et sont parfois incompatibles avec certaines réactions nécessitant une grande rigueur expérimentale. Ce problème est essentiellement technologique et a été au moins en partie résolu par l'utilisation de robots notamment dans l'industrie. Une société comme Chemspeed par exemple fournit des robots capables de réaliser un grand nombre de réactions chimiques en mode parallèle, allant de la pesée automatisée des réactifs et leur distribution dans des réacteurs multiples jusqu'à l'analyse des bruts réactionnels. L'utilisation de tels robots est l'une des voies pouvant réduire le temps nécessaire à la découverte de nouveaux catalyseurs d'intérêt mais cette approche technologique trouvera probablement toute son efficacité lorsqu'elle pourra être alliée à une conception et une synthèse de catalyseur de grande ampleur. En effet, la préparation des catalyseurs asymétriques notamment, impliquant la synthèse de ligands chiraux, nécessite de gros efforts de synthèse et par conséquent demande du temps. En revanche, la capacité à générer « rapidement » de la diversité structurale peut être obtenue dans les systèmes hybrides constitués de systèmes organométalliques enfouis dans des sites protéiques assurant le rôle de copule

chirale. Dans ce cas, la difficulté à générer de larges banques de complexes organométalliques chiraux est contournée en utilisant la diversité structurale des macromolécules biologiques. Ces projets très prometteurs ont déjà été abordés avec succès surtout avec les systèmes streptavidine/biotine¹⁶⁵.

¹⁶⁵ a) J. Collot, N. Humbert, A. Zocchi, J. Gradinaru, M. Skander, A. Loosli, J. Sauser, G. Klein, T. R. Ward, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14411; b) C. Letondor, N. Humbert, T.R. Ward, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 4683; c) G. Klein, N. Humbert, J. Gradinaru, A. Ivanova, F. Gilardoni, U.E. Rusbandi, T.R. Ward, *Angew. Chem. Intl. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 7764; d) C. Letondor, A. Pordea, N. Humbert, A. Ivanova, S. Mazurek, M. Novic, T.R. Ward, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8320.

PARTIE EXPERIMENTALE

Les solvants et réactifs

Les produits chimiques commerciaux sont achetés auprès d'Aldrich, Acros, Lancaster, Fluka, Sigma, Bachem et sont utilisés sans aucune purification préalable.

Les solvants anhydres sont préparés par distillation sous atmosphère d'azote en présence de leurs agents desséchants respectifs.

Solvant	Agent desséchant
Acétonitrile	Hydruure de calcium
Ether diéthylique	Sodium-benzophénone
Tetrahydrofuranne	Sodium-benzophénone
Dichlorométhane	Hydruure de calcium

Les chromatographies

Les chromatographies analytiques sur couche mince sont effectuées sur des plaques de verre recouvertes de silice 0,25 mm (60 F₂₅₄, Merck).

La révélation des plaques est effectuée par illumination ultraviolette à 254 nm et/ou par traitement avec un révélateur. Les révélateurs utilisés dans la majorité des cas sont les vapeurs d'iode ou une solution aqueuse de permanganate de potassium à 0,05%, suivie du chauffage de la plaque CCM à 100°C.

Les purifications par chromatographie sur colonne ont été réalisées en utilisant du gel de silice Merck Kieselgel 60, granulométrie 40-63 µm.

Les analyses par CLHP

Les analyses par CLHP ont été réalisées en utilisant deux chaînes Merck Hitachi, équipées de pompes L 6200 et de détecteurs UV-VIS L 4250 et L 3000 respectivement et sur un système Shimadzu Prominence équipé d'une pompe binaire LC 20 AB, un passeur d'échantillons – injecteur SIL 20 A et un détecteur UV-VIS SPD 20 A.

Les colonnes CLHP utilisées sont la Chiralcel OD et les Chiralpak AD et AD-RH (Daicel Chemical Industries Ltd.).

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres de RMN (¹H et ¹³C) ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker Avance 400. Les fréquences de résonance sont de 400,13 MHz pour le proton et de 100,62 pour le carbone.

Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm par rapport à une référence dont le déplacement est connu (tétraméthylsilane, TMS δ=0,00 ppm). Les constantes de couplage sont exprimées en Hz.

Dans la description des spectres les multiplicités des signaux sont indiqués par les abréviations suivantes : s (singulet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), dd (doublet de doublets), dt (doublet de triplets), m (massif), l (large), app (apparent).

Les spectres infrarouge (IR)

Les spectres d'absorption infrarouge (IR) sont enregistrés sur un spectromètre Perkin Elmer System 2000 FT-IR. Des pastilles de NaCl sont utilisées pour les composés liquides ou les

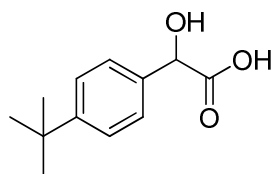
huiles, tandis que les composés solides sont inclus dans des pastilles de KBr. Les nombres d'onde des bandes d'absorption sont exprimés en cm^{-1} à leur intensité maximale.

Les spectres de masse (SM)

Les spectres de masse par impact électronique (70 eV) sont effectués sur un appareil Hewlett Packard 5873 faisant partie d'un ensemble CPV/MS Hewlett Packard 6890 series. Les spectres de masse en mode ionisation chimique dans l'ammoniac (IC/ NH_3) sont obtenus sur un spectromètre Finnigan – MAT 4600 quadripolaire couplé et piloté par un système informatique Onyx. Les spectres de masse en mode electrospray ont eux été réalisés sur un spectromètre ESI/TOF Mariner (IES). Les spectres de masse en mode electrospray positif ont été obtenus sur un spectromètre de masse Waters Micromass ZQ faisant partie d'un couplage CLHP/SM Waters.

Mise en garde *Les composés de type diazo sont des composés toxiques et potentiellement explosifs, et par conséquent, l'expérimentateur doit les manipuler avec précaution, ainsi que les réactifs impliqués dans leur synthèse, comme les azotures de sulfonyle. La présence d'un groupement carbonyle en position α par rapport au groupement diazo stabilise ce genre de composé contre la décomposition thermique. Idéalement, ce type de produit doit être stocké à 0°C à l'abri de la lumière. Malgré le nombre très important d'expériences que nous avons mené sur des substrats de ce type nous n'avons observé aucune explosion ou décomposition thermique.*

Acide 2-(4-*tert*-butylphényl)-2-hydroxyacétique



FB C₁₂H₁₆O₃.

PM 208,25 g·mol⁻¹.

Aspect : solide cristallin blanc

A un mélange de 12 mL de dioxane et de 12 g de glace sont additionnés successivement 2 mL de 4-*tert*-butyl-benzaldéhyde (11,94 mmole), 1,020 g de chlorure de lithium (24 mmole) et 3,250 g d'hydroxyde de potassium à 85% (49,2 mmole). Le mélange est laissé agiter 5 minutes puis 1,04 mL de bromoforme (11,90 mmole) sont additionnés. Après une heure à 0°C le mélange est laissé revenir à température ambiante. Après 72 heures, 12 mL d'eau sont ajoutés au milieu réactionnel qui est ensuite acidifié à pH 1 avec du HCl aqueux 1M. Le produit est extrait à l'éther (3 x 50 mL). Les phases organiques réunies sont séchées sur sulfate de magnésium anhydre puis évaporées pour fournir l'alpha hydroxy acide brut sous forme d'un solide pâteux jaune (2,37 g, 95%). Le produit est utilisé pour l'étape suivante sans purification préalable. Un échantillon analytique d'alpha hydroxy-acide est recristallisé dans du chloroforme.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz, TMS, ppm) : δ= 1,31 (s, 9H, tBu), 5,23 (s, 1H, CH), 7,37 (d, 2H, 8,4 Hz, H_{ar}), 7,41 (d, 2H, 8,4 Hz, H_{ar}).

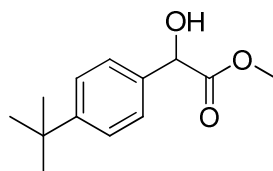
RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz, TMS, ppm): δ= 31,3, 34,6, 72,5, 125,7, 126,3, 134,5, 151,9, 177,4.

SM (IES): m/z (%)= 209 ([M+1]⁺).

IR (pastille KBr, cm⁻¹) : 3437, 2966, 2697, 1717, 1271, 1083, 819.

CLHP chirale (Chiralpak AD-RH, Acétonitrile/Eau/TFA 20/80/0,1 à 1 mL/min., UV 210 nm, 40°C) : t_{r1} 13,60 min, t_{r2} 15,77 min.

2-(4-*tert*-butylphényl)-2-hydroxyacétate de méthyle



FB C₁₃H₁₈O₃.

PM 222,28 g·mol⁻¹.

Aspect : solide cristallin blanc-jaune

1 g d'alpha hydroxy acide (4,8 mmole) est solubilisé dans 15 mL de méthanol anhydre, puis 30 mg d'acide borique (0,49 mmole, 10%) sont additionnés au milieu réactionnel. Le mélange est agité une nuit à température ambiante puis le milieu réactionnel est évaporé pour fournir le produit brut sous forme d'une huile jaune. Purification par chromatographie sur silice (éluant hexane/acétate d'éthyle 80/20). Obtention de 247 mg (23%) de produit huile jaune qui cristallise au congélateur.

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, TMS, ppm) : δ = 1,31 (s, 9H, tBu), 3,77 (s, 3H, CO_2CH_3), 5,16 (s, 1H, CH), 7,33 (d, 2H, 8,4 Hz, H_{ar}), 7,39 (d, 2H, 8,4 Hz, H_{ar}).

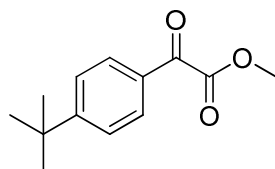
RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, TMS, ppm): δ = 31,4, 34,7, 53,1, 72,9, 125,8, 126,4, 135,4, 151,7, 174,4.

SM (IE, 70 eV): $m/z(\%)$: 41(7), 57(28), 77(8), 91(12), 105(8), 133(12), 147(6), 148(17), 163(100), 164(17), 207(10), 222(6).

IR (pastille KBr, cm^{-1}) : 3455, 2968, 2697, 1738, 1198, 1090, 830.

CLHP chirale (Chiralcel OD, Hexane/Ethanol 99/1 à 1 mL/min., UV 220 nm, 35°C) : $t_{\text{r}1}$ 13,64 min (*S*), $t_{\text{r}2}$ 16,55 min (*R*).

2-(4-*tert*-butylphényl)-2-oxoacétate de méthyle



FB $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_3$.

PM 220,26 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Aspect : huile incolore

Méthode A: 400 mg de 2-(4-*tert*-butylphényl)-2-hydroxyacétate de méthyle (1,8 mmole) sont dissous dans 150 mL d'acétone anhydre puis 3,2 g d'oxyde de manganèse (IV) activé sont ajoutés au milieu. Après 18 heures l'oxyde est filtré sur filtre Millipore® et le filtrat évaporé. 374 mg (94%) d'une huile légèrement jaunâtre sont obtenus.

Méthode B : A une solution de 4-*tert*-butyl-phényl acétate (4 mL, 19,37 mmole) dans 15 mL d'acétonitrile anhydre, est additionnée, à 0°C, la DBU (4,055 mL, 1,4 équivalents, 27,12 mmole). Après 15 minutes est additionnée une solution d'azoture de para-tosyle (5,34 g, 1,4 équivalents, 27,12 mmole) et le milieu est laissé revenir *lentement* à température ambiante. A la fin de la réaction (une nuit, contrôle CCM hexane-acétate d'éthyle 95/5) sont additionnés au milieu successivement 30 mL de benzène, 20 mL d'acétone et 30 mL d'eau, 60,2 g de NaHCO_3 (71,66 mmole, 3,7 équivalents) et 120 g d'Oxone® (monopersulfate, 195,2 mmole, \cong 10 équivalents). Après une heure, l'oxydation est complète (disparition de la couleur orange du composé diazo, contrôle CCM hexane-acétate d'éthyle 95/5). Filtration des sels, lavage à l'éther des sels puis le filtrat est extrait à l'éther (3 x 150 mL). Les phases organiques réunies sont séchées sur sulfate de sodium anhydre et évaporées. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant hexane acétate d'éthyle 95/5) pour fournir le produit attendu sous forme d'une huile incolore (3,039 g, 71%).

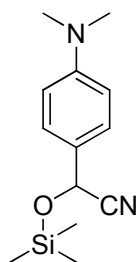
RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, TMS, ppm) : δ = 1,29 (s, 9H, tBu), 3,93 (s, 3H, CO_2CH_3), 7,48 (d, 2H, 8,8 Hz, H_{ar}), 7,91 (d, 2H, 8,4 Hz, H_{ar}).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, TMS, ppm): δ = 30,9, 35,3, 52,5, 125,8, 129,8, 130,0, 159,0, 164,2, 185,6.

SM (IE, 70 eV): m/z (%) = 77(13), 91(24), 105(14), 115(17), 117(17), 118(36), 146(40), 161(100), 162(40), 205(12), 220(1).

IR (pur, cm^{-1}) : 2964, 2907, 2872, 1742, 1685, 1603, 1216, 1176, 1003.

2-(4-(diméthylamino)phényl)-2-(triméthylsilyloxy)acetonitrile



FB $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{OSi}$.

PM 248,40 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Aspect : solide beige

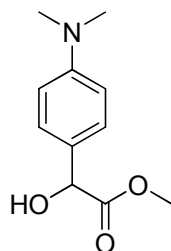
A une solution de 4-(diméthylamino)benzaldéhyde (2 g, 13,42 mmole) dans 25 mL de dichlorométhane distillé, refroidie à 0° C à l'aide d'un bain de glace sont additionnés, goutte à goutte, le cyanure de triméthylsilyle (5,4 mL, 40,5 mmole) puis 600 μL de triéthylamine. Après 24 heures à 4°C le contrôle par CCM montre que la réaction est complète ; le produit est isolé par l'évaporation du solvant. On obtient un solide beige, 3,14 g (95%).

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, TMS, ppm): δ = 0,19 (s, 9H, TMS), 2,98 (s, 6H, 2 x CH_3), 5,39 (s, 1H, CH), 6,70 (d, 2H, 8,8 Hz, H_{ar}), 7,31 (d, 2H, 8,8 Hz, H_{ar}).

SM (IE, 70 eV): m/z (%) = 105(22), 143(21), 148(36), 159(100), 222(31), 248(70).

IR (pastille KBr, cm^{-1}) : 3434, 2952, 2895, 2813, 1616, 1565, 1527, 1446, 1367, 1257, 1229, 1187, 1167.

2-(4-(diméthylamino)phényl)-2-hydroxyacétate de méthyle



FB $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_3$.

PM 209,24 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Aspect : solide jaune

11 mL de chlorure d'acétyle sont additionnés goutte à goutte dans 160 mL de méthanol anhydre, refroidi à 0°C. Après 30 min., toujours à 0°C, sur la solution résultante on canule (goutte à goutte) une solution de 2,64 g de cyanhydrine synthétisée antérieurement (10,6 mmole) dans 20 mL de méthanol anhydre. Après 72 h à 4°C le solvant est évaporé, le résidu repris dans 20 mL d'eau et neutralisé (pH 8) avec 50 mL d'une solution aqueuse molaire de bicarbonate de

sodium. La solution résultante est extraite à l'acétate d'éthyle (3 x 50 mL). Les phases organiques réunies sont séchées sur sulfate de magnésium anhydre puis évaporées pour fournir le produit brut sous forme d'un solide marron (2,42 g). Ce résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice pour fournir le produit pur sous forme d'un solide jaune (0,944 g, 43%).

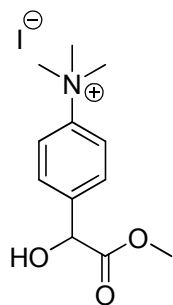
RMN ^1H (MeOD, 400 MHz, TMS, ppm): δ = 2,92 (s, 6H, 2 x CH₃), 3,68 (s, 3H, CO₂CH₃), 5,06 (s, 1H, CH), 6,74 (d, 2H, 8,8 Hz, H_{ar}), 7,23 (d, 2H, 8,8 Hz, H_{ar}).

RMN ^{13}C (CDCl₃, 100 MHz, TMS, ppm): δ = 40,4, 52,7, 72,7, 112,3, 125,9, 127,6, 150,6, 174,6.

SM (IES): m/z (%) = 210 ([M+1]⁺), (IE, 70 eV): m/z (%) = 120(16), 150(100), 209(21).

IR (pastille KBr, cm⁻¹) : 3451, 2952, 2886, 2798, 1737, 1615, 1524, 1433, 1351, 1270, 1192.

Iodure de 4-(1-hydroxy-2-méthoxy-2-oxoéthyl)-N,N,N-triméthylbenzenaminium



FB C₁₂H₁₈INO₃.

PM 351,18 g·mol⁻¹.

Aspect : solide jaune

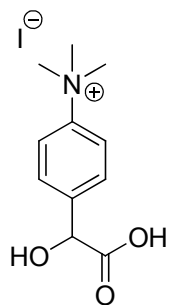
A une solution de 285 mg de α -hydroxyester obtenu précédemment (1,36 mmole) dans 10 mL d'acétone anhydre on ajoute 220 μL de iodure de méthyle (3,53 mmole). Reflux pendant 18 heures. Le contrôle par CCM montre que la réaction n'est pas terminée alors 250 μL supplémentaires de iodure de méthyle (4,02 mmole) sont additionnés au milieu. Après 4 heures à reflux la réaction est complète. Le solvant est évaporé, le résidu est repris dans 1 mL de méthanol anhydre puis précipité par l'addition de 10 mL d'éther distillé. 375 mg (78%) d'un solide jaune sont obtenus.

RMN ^1H (D₂O, 400 MHz, TMS, ppm): δ = 3,68 (s, 9H, 3 x CH₃), 3,78 (s, 3H, CO₂CH₃), 5,51 (s, 1H, CH), 7,73 (d, 2H, 9,2 Hz, H_{ar}), 7,91 (d, 2H, 9,2 Hz, H_{ar}).

SM (IES): m/z (%) = 224 ([M-I]⁺).

IR (pastille KBr, cm⁻¹) : 3480, 3011, 1715, 1464, 1437, 1322, 1235, 1213.

Iodure de 4-(carboxy(hydroxy)méthyl)-N,N,N-triméthylbenzenaminium



FB C₁₁H₁₆INO₃.

PM 337,15 g·mol⁻¹.

Aspect : solide blanc

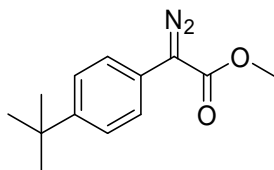
Une solution de 350 mg (1 mmole) de α -hydroxyester dans 5 mL de méthanol est traitée avec 1,3 mL d'une solution aqueuse à 0,77 M d'hydroxyde de potassium. Après 2 heures à t.a. le milieu est neutralisé par une solution aqueuse à 0,1 M d'acide chlorhydrique. Le tout est porté à sec et ensuite repris dans 4 mL de méthanol. Le solide est filtré sur filtre Acrodisc 0,2 μ m et au filtrat est additionné de l'éther anhydre ce qui conduit à la précipitation d'un produit blanc, isolé par filtration (300 mg, 90%).

RMN ¹H (D₂O, 300 MHz, TMS, ppm): δ = 3,67 (s, 9H, 3 x CH₃), 5,14 (s, 1H, CH), 7,69 (d, 2H, 8,6 Hz, H_{ar}), 7,85 (d, 2H, 9,2 Hz, H_{ar}).

SM (IES): m/z (%)= 210 ([M-I]⁺).

CLHP chirale (Chirobiotic T, ACN/Eau 20/80 à 0,8 mL/min., UV 220 nm, 35°C) : t_{r1} 12,77 min, t_{r2} 25,65 min .

2-(4-tert-butylphényl)-2-diazoacétate de méthyle



FB C₁₃H₁₆N₂O₂.

PM 232,28 g·mol⁻¹.

Aspect : solide orange

A une solution de 2,6 mL (12,59 mmole) de 4-tert-butyl-phénylacétate dans 10 mL d'acétonitrile anhydre refroidie à 0°C par un bain de glace sont additionnés 2,6 mL de DBU (17,4 mmol). Après 10 min., toujours à 0°C, une solution de *para*-tosylazoture (3,47 g, 17,4 mmole) dans 10 mL d'acétonitrile anhydre est ajoutée goutte à goutte au milieu réactionnel. Le mélange est laissé revenir très lentement à t.a. Après 18 heures, le milieu est neutralisé avec 17 mL d'une solution aqueuse à 5% d'hydroxyde de potassium. Après évaporation à sec le résidu est repris dans 20 mL d'eau et extrait à l'acétate d'éthyle (3 x 20 mL). Les phases organiques réunies sont séchées avec du sulfate de sodium anhydre et évaporées pour fournir un solide orange. Purification par chromatographie sur gel de silice (éluant hexane/acétate d'éthyle 98/2) pour fournir le produit pur, 2,213 g (76%), solide orange.

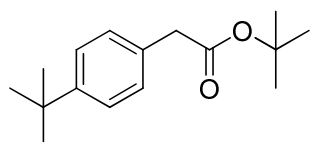
RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, TMS, ppm) : δ = 1,33 (s, 9H, tBu), 3,87 (s, 3H, Me), 7,42 (s, 4H, H_{ar}).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, TMS, ppm): δ = 31,2, 34,4, 51,9, 62,8, 122,1, 124,0, 125,9, 149,0, 165,8.

SM (ESI+) m/z : 255 ($[\text{M}+\text{Na}^+]$).

IR (pastille KBr, cm^{-1}) : 2954, 2106, 1699, 1518, 1439, 1352, 1246, 1189, 1159, 1050.

2-(4-*tert*-butylphényl)acétate de *tert*-butyle



FB $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_2$.

PM 248,36 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

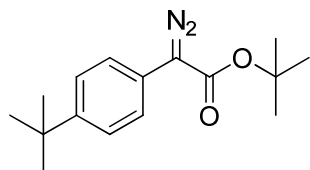
Aspect : huile incolore

A une solution de 1,853 mL de *tert*-butanol anhydre (19,38 mmole) dans 20 mL de THF distillé, refroidie à -10°C , sont additionnés goutte à goutte 7,75 mL d'une solution de *n*-butyl lithium à 2,5 M dans l'hexane. Après 10 min., une solution de 2 mL de 4-*tert*-butylphénylacétate de méthyle (9,69 mmole) dans 5 mL de THF anhydre est additionnée au milieu qui ensuite est laissé revenir lentement à t.a. Après 18 heures, le solvant est évaporé, le résidu repris dans 30 mL d'eau et extrait à l'acétate d'éthyle (3 x 50 mL). Les phases organiques réunies sont séchées sur sulfate de sodium anhydre puis évaporées pour fournir le produit attendu pur sous forme d'une huile incolore (2,166 g, 90%)¹⁶⁶.

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, TMS, ppm): δ = 1,31 (s, 9H, tBu), 1,45 (s, 9H, $\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 3,50 (s, 3H, CH_3), 7,20 (d, 2H, 8,4 Hz, H_{ar}), 7,34 (d, 2H, 8,4 Hz, H_{ar}).

SM (IE, 70 eV) m/z (%) : 41(36), 57(100), 117(35), 133(45), 147(80), 148(41), 177(29), 248(27).

2-(4-*tert*-butylphényl)-2-diazoacétate de *tert*-butyle



FB $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$.

PM 274,36 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Aspect : huile orange

¹⁶⁶ Selon une procédure décrite par B.B. Bhawal, S.P. Khanapure, E.R. Biehl, *Synthesis* **1990**, 112.

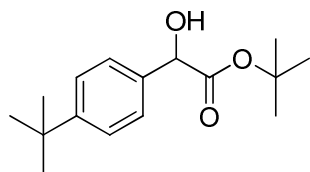
1 g de 2-(4-*tert*-butylphényl)acétate de *tert*-butyle (4,03 mmole) est solubilisé dans 4 mL d'acétonitrile anhydre puis 843 μ L de DBU (5,64 mmole) sont additionnés au milieu. Après 30 min. toujours à 0°C, la *para*-tosylazoture est additionnée au milieu sous forme de solution dans 4 mL d'acétonitrile anhydre (1,111 g, 5,64 mmole). Le milieu est laissé revenir lentement à t.a. Après 24 heures, neutralisation avec 6 mL NaOH aq. 5%, évaporation à sec, reprise du résidu dans 10 mL d'eau et extraction à l'éther (2 x 10 mL). Les phases organiques réunies sont ensuite séchées sur sulfate de sodium anhydre. La purification par chromatographie sur gel de silice (éluant hexane/acétate d'éthyle 98/2) permet d'isoler le produit pur sous forme d'une huile rouge (301 mg, 27%).

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, TMS, ppm) : δ = 1,31 (s, 9H, tBu), 1,55 (s, 9H, tBu), 7,40 (s, 4H, H_{ar}).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, TMS, ppm): δ = 22,6, 28,3, 31,2, 34,4, 81,8, 122,7, 123,9, 125,8, 148,7, 164,8.

IR (entre deux faces NaCl, cm^{-1}) : 2966, 2905, 2870, 2082, 1702, 1516, 1368, 1346, 1290, 1266, 1249, 1148, 1112.

***tert*-butyl 2-(4-*tert*-butylphényl)-2-hydroxyacétate**



FB $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_3$.

PM 264,36 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Aspect : huile incolore

A une solution de 2-(4-*tert*-butylphényl)-2-diazoacétate de *tert*-butyle (30 mg, 0,11 mmole) dans 1 mL de dichlorométhane distillé sont additionnés 5 μ L d'eau distillée, puis 1,3 mg de $[\text{RuCl}_2(p\text{-cym})]_2$. Après une heure le milieu est évaporé et le résidu purifié par chromatographie sur gel de silice (hexane/acétate d'éthyle 90/10) pour fournir le produit attendu sous forme d'une huile incolore (2,8 mg, 10%).

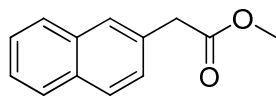
RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, TMS, ppm) : δ = 1,31 (s, 9H, tBu ester), 1,43 (s, 9H, tBu), 3,39 (d, 1H, 6,4 Hz, OH), 5,01 (d, 1H, 5,6 Hz, CH), 7,32 (d, 2H, 8,4 Hz, H_{ar}), 7,37 (d, 2H, 8,8 Hz, H_{ar}).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, TMS, ppm): δ = 27,8, 31,2, 34,5, 72,7, 82,9, 125,3, 126,0, 135,9, 151,0, 172,9.

SM (IE, 70 eV) : m/z (%) : 41(24), 57(77), 91(17), 133(18), 148(19), 163(100), 164(35), 264(1).

CLHP chirale (Chiralcel OD, Hexane/isoPropanol 99/1 à 1 mL/min., UV 220 nm, 35°C) : $t_{\text{r}1}$ 9,15 min, $t_{\text{r}2}$ 13,64 min.

2-(naphthalen-2-yl)acétate de méthyle



FB C₁₃H₁₂O₂.

PM 200,23 g·mol⁻¹.

Aspect : huile incolore

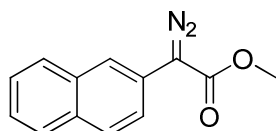
1,034 g d'acide 2 naphthylacétique (5,56 mmole) sont solubilisés dans 20 mL de méthanol anhydre puis quatre gouttes d'acide sulfurique concentré sont ajoutés au milieu qui est porté à reflux. Après deux heures le milieu est refroidi puis neutralisé avec une solution aqueuse molaire de bicarbonate de sodium puis évaporé à sec. Le résidu est repris dans 15 mL d'eau et extrait à l'acétate d'éthyle (2 x 30 mL). Les phases organiques réunies sont séchées sur sulfate de sodium anhydre et évaporées pour fournir le produit attendu sous forme d'une huile incolore (1,095 g, 99%).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz, TMS, ppm) : δ= 3,73 (s, 3H, CH₃), 3,82 (s, 2H, CH₂), 7,44-7,52 (m, 3H, H_{ar}), 7,76 (s, 1H, H_{ar}), 7,82-7,85 (m, 3H, H_{ar}).

SM (ESI+) m/z : 201 (M+H⁺).

IR (entre deux faces NaCl, cm⁻¹): 3055, 3023, 2951, 1738, 1509, 1435, 1333, 1299, 1263, 1198, 1162, 1017.

2-diazo-2-(naphthalen-2-yl)acétate de méthyle



FB C₁₃H₁₀N₂O₂.

PM 226,23 g·mol⁻¹.

Aspect : solide orange

A une solution de 800 mg de 2-naphthylacétate de méthyle (4 mmole) dans 10 mL d'acétonitrile anhydre, 1,1 mL de DBU sont additionnés goutte à goutte (7,34 mmole) à t.a. Après 15 minutes, 1,25 g d'azoture de 4-méthylbenzenesulfonyl (6,32 mmole) sont additionnés au milieu réactionnel, sous forme de solution dans 4 mL d'acétonitrile anhydre. Après 18 heures, neutralisation du milieu avec 5 mL d'une solution aqueuse de potasse à 5%, suivi d'évaporation à sec, puis reprise du résidu dans 15 mL d'eau et extrait à l'éther (3 x 30 mL). Les phases organiques réunies sont séchées sur sulfate de magnésium anhydre puis évaporées pour fournir le produit attendu sous forme d'un solide orange (925 mg, quantitatif).

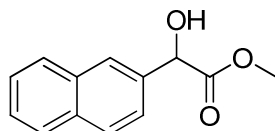
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz, TMS, ppm) : δ= 3,91 (s, 3H, Me), 7,43-7,55 (m, 3H, H_{Ar}), 7,79-7,86 (m, 3H, H_{Ar}).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz, TMS, ppm): δ= 52,0, 63,7, 121,8, 122,5, 122,6, 125,7, 126,6, 127,56, 127,59, 128,6, 131,4, 133,6, 165,7.

SM (ESI+) m/z : 219 ($[M-N_2+Na]^+$).

IR (pastille KBr, cm^{-1}) : 3052, 2958, 2103, 1705, 1627, 1596, 1436, 1326, 1249, 1203, 1186, 1154, 1123.

2-hydroxy-2-(naphthalen-2-yl)acétate de méthyle¹⁶⁷



FB $C_{13}H_{12}O_3$.

PM 216,23 $g \cdot mol^{-1}$.

Aspect : solide blanc

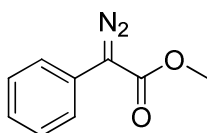
A une solution de 2-diazo-2-(naphthalen-2-yl)acétate de méthyle (30 mg, 0,13 mmole) dans 1 mL de dichlorométhane distillé sont additionnés 5 μL d'eau distillée, puis 1,6 mg de $[RuCl_2(p-cym)]$. Après une heure le milieu est évaporé et le résidu purifié par chromatographie sur gel de silice (hexane/acétate d'éthyle 90/10) pour fournir le produit attendu sous forme d'un solide blanc cristallin (20 mg, 71%).

RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz, TMS, ppm) : δ = 3,77 (s, 3H, CH_3), 5,36 (s, 1H, CH), 7,53-7,49 (m, 3H, H_{ar}), 7,87-7,83 (m, 3H, H_{ar}), 7,91 (s, 1H, H_{ar}).

SM (IE, 70 eV) : m/z (%) : 28(59), 127(78), 128(56), 129(100), 155(68), 157(100), 216(36).

CLHP chirale (Chiralcel OD, Hexane/Ethanol 95/5 à 1 mL/min., UV 220 nm, 35°C) : t_{r1} 12,75 min, t_{r2} 13,84 min.

2-diazo-2-phénylacétate de méthyle



FB $C_9H_8N_2O_2$.

PM 176,17 $g \cdot mol^{-1}$.

Aspect : huile orange

A une solution de 2 mL de phénylacétate de méthyle (14,2 mmole) dans 20 mL d'acétonitrile anhydre, 3 mL de DBU sont additionnés goutte à goutte (20 mmole) à t.a. Après 15 minutes, 3,929 g d'azoture de 4-méthylbenzenesulfonyl (19,88 mmole) sont additionnés au milieu réactionnel, sous forme de solution dans 10 mL d'acétonitrile anhydre. Après 18 heures, neutralisation du milieu avec 18 mL d'une solution aqueuse de potasse à 5%, suivi d'évaporation à sec, puis reprise du résidu dans 30 mL d'eau et extrait à l'éther (3 x 75 mL). Les phases

¹⁶⁷ Sh. Laptov, J.M. Seco, E. Quinoa, R. Riguera, *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 504 (spectroscopie RMN).

organiques réunies sont séchées sur sulfate de magnésium anhydre puis évaporées pour fournir le produit attendu sous forme d'une huile orange (2,365 g, 95%).

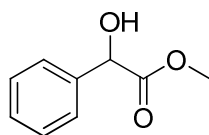
RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, TMS, ppm) : δ = 3,87 (s, 3H, Me), 7,19 (t, 1H, 7,6 Hz, H_{ar}), 7,39 (t, 2H, 8,0 Hz, H_{ar}), 7,48 (d, 2H, 7,6 Hz, H_{ar}).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, TMS, ppm): δ = 51,9, 123,9, 125,4, 125,8, 128,9, 165,6.

SM (ESI+) m/z : 171 ($[\text{M}-\text{N}_2+\text{Na}]^+$).

IR (entre deux faces NaCl, cm^{-1}) : 3060, 3026, 3002, 2954, 2089, 1706, 1599, 1576, 1499, 1435, 1353, 1287, 1250, 1193, 1155.

2-hydroxy-2-phénylacétate de méthyle¹⁶⁸



FB $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_3$.

PM 166,17 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Aspect : huile incolore

A une solution de 2-diazo-2-phénylacétate de méthyle (30 mg, 0,17 mmole) dans 1 mL de dichlorométhane distillé sont additionnés 5 μL d'eau distillée, puis 2 mg de $[\text{RuCl}_2(p\text{-cym})]$. Après une heure le milieu est évaporé et le résidu purifié par chromatographie sur gel de silice (hexane/acétate d'éthyle 90/10) pour fournir le produit attendu sous forme d'une huile incolore (20 mg, 71%).

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, TMS, ppm) : δ = 3,42 (d, 1H, 5,6 Hz, OH), 3,77 (s, 3H, CH_3), 5,19 (d, 1H, 5,2 Hz, CH), 7,44-7,34 (m, 5H, H_{ar}).

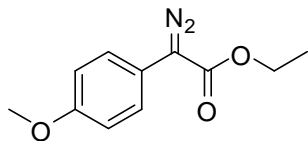
RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, TMS, ppm): δ = 53,0, 72,8, 126,5, 128,5, 128,6, 138,2, 174,1.

SM (IE, 70 eV) : m/z (%) : 51(12), 77(41), 79(62), 107(100), 166(18).

CLHP chirale (Chiralcel OD, Hexane/Ethanol 95/5 à 1 mL/min., UV 220 nm, 35°C) : $t_{\text{r}1}$ 8,84 min, $t_{\text{r}2}$ 12,14 min.

¹⁶⁸ W. Zhang, M. Shi, *Chem. Commun.* **2006**, 1218 (spectroscopie RMN).

2-diazo-2-(4-méthoxyphényl)acétate d'éthyle



FB C₁₁H₁₂N₂O₃.

PM 220,22 g·mol⁻¹.

Aspect : solide orange

A une solution de 2,91 g de 4-méthoxyphénylacétate d'éthyle (14,5 mmoles) dans 10 mL d'acétonitrile anhydre sont additionnés à 0°C 3 mL de DBU (20,3 mmoles) puis, après 10 min. 4 g d'azoture de tosylo (20,3 mmoles) sous forme de solution dans 10 mL d'acétonitrile anhydre. Le mélange est laissé revenir lentement à t.a. et, après 18 h. 20 mL d'une solution aqueuse de KOH à 5% sont additionnés. Le mélange est extrait à l'éther éthylique (3 x 50 mL). Les phases organiques réunies sont séchées avec du sulfate de magnésium anhydre puis évaporées. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant dichlorométhane/cyclohexane 80/20) pour fournir le produit attendu sous forme d'un solide orange (1,957 g, 61%).

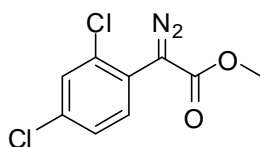
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz, TMS, ppm) : δ= 1,34 (t, 3H, 6,8 Hz, CH₃), 3,81 (s, 3H, CH₃), 4,32 (q, 2H, 7,2 Hz, CH₂), 6,94 (dd, 2H, 6,8 Hz, 2,0 Hz, H_{ar}), 7,39 (dd, 2H, 7,2 Hz, 2,0 Hz, H_{ar}).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz, TMS, ppm): δ= 14,4, 55,2 60,8, 114,5, 116,9, 125,8, 157,9, 165,6.

SM (IES) : m/z (%) : 193 ([M-N₂+1]⁺), 243 ([M+23]⁺).

IR (KBr, cm⁻¹) : 2982, 2091, 1695, 1609, 1512, 1478, 1468, 1443, 1367, 1296, 1254, 1164.

2-diazo-2-(2,4-dichlorophényl)acétate de méthyle



FB C₉H₆Cl₂N₂O₂.

PM 245,06 g·mol⁻¹.

Aspect : solide jaune

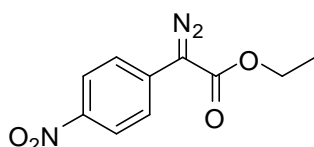
A une solution de 2,86 g de 2,4-dichlorophénylacétate de méthyle (12,9 mmoles) dans 10 mL d'acétonitrile anhydre sont additionnés à 0°C 2,7 mL de DBU (18,06 mmoles) puis, après 10 min. 3,57 g d'azoture de tosylo (18,06 mmoles) sous forme de solution dans 10 mL d'acétonitrile anhydre. Le mélange est laissé revenir lentement à t.a. et, après 18 h. 17 mL d'une solution aqueuse de KOH à 5% sont additionnés. Le mélange est extrait à l'éther éthylique (3 x 50 mL). Les phases organiques réunies sont séchées avec du sulfate de magnésium anhydre puis évaporées. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant dichlorométhane/cyclohexane 60/40) pour fournir le produit attendu sous forme d'un solide jaune (3,057 g, 97%).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz, TMS, ppm) : δ= 3,85 (s, 3H, CH₃), 7,31 (dd, 1H, 8,4 Hz, 2,4 Hz, H_{ar}), 7,45 (d, 1H, 2,0 Hz, H_{ar}), 7,49 (d, 1H, 8,4 Hz, H_{ar}).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, TMS, ppm): δ = 52,3, 122,5, 127,5, 129,7, 132,8, 134,0, 134,7, 165,5.

IR (KBr, cm^{-1}): 3097, 3075, 2956, 2103, 1709, 1484, 1430, 1382, 1350, 1294, 1252, 1196, 1161, 1107.

2-diazo-2-(4-nitrophényl)acétate d'éthyle



FB $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_4$.

PM 235,2 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Aspect : solide jaune

A une solution de 2,808 g de 4-nitrophénylacétate d'éthyle (13 mmoles) dans 10 mL d'acétonitrile anhydre sont additionnés à 0°C 2,8 mL de DBU (18,4 mmoles) puis, après 10 min. 3,63 g d'azoture de tosylo (18,4 mmoles) sous forme de solution dans 10 mL d'acétonitrile anhydre. Le mélange est laissé revenir lentement à t.a. et, après 18 h. 17 mL d'une solution aqueuse de KOH à 5% sont additionnés. Le mélange est extrait à l'éther éthylique (3 x 50 mL). Les phases organiques réunies sont séchées avec du sulfate de magnésium anhydre puis évaporées. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant dichlorométhane/cyclohexane 80/20) pour fournir le produit attendu sous forme d'un solide jaune (471 mg, 17%).

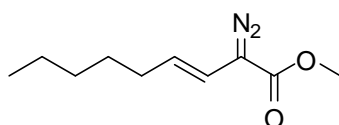
RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, TMS, ppm) : δ = 1,37 (t, 3H, 7,2 Hz, CH_3), 4,37 (q, 2H, 7,2 Hz, CH_2), 7,67 (dt, 2H, 9,2 Hz, 2,4 Hz, H_{ar}), 8,23 (dt, 2H, 9,2 Hz, 2,4 Hz, H_{ar}).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, TMS, ppm): δ = 14,3, 61,5, 122,9, 124,0, 134,0, 144,7, 163,5.

SM (IES) : m/z (%) : 236 ($[\text{M}+1]^+$).

IR (KBr, cm^{-1}) : 2102, 1693, 1591, 1509, 1498, 1327, 1228, 1163.

2-diazonon-3-enoate de méthyle



FB $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$.

PM 196,25 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Aspect : huile orange

A une solution de 3,07 g de 3-nonenoate de méthyle (17,3 mmoles) dans 13 mL d'acétonitrile anhydre sont additionnés à 0°C 3,7 mL de DBU (24,2 mmoles) puis, après 10 min.

4,8 g d'azoture de tosylate (24,2 mmoles) sous forme de solution dans 13 mL d'acétonitrile anhydre. Le mélange est laissé revenir lentement à t.a. et, après 18 h. 25 mL d'une solution aqueuse de KOH à 5% sont additionnés. Le mélange est extrait à l'éther éthylique (3 x 50 mL). Les phases organiques réunies sont séchées avec du sulfate de magnésium anhydre puis évaporées. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant dichlorométhane/cyclohexane 80/20) pour fournir le produit attendu sous forme d'un solide jaune (2,04 g, 60%).

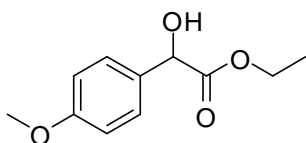
RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, TMS, ppm) : δ = 0,88 (t, 3H, 6,8 Hz, CH_3), 1,26-1,43 (m, 6H, 3 x CH_2), 2,16 (dq, 2H, 7,2 Hz, 1,2 Hz, CH_2), 3,80 (s, 3H, CH_3), 5,28-5,36 (m, 1H, CH), 5,72 (d, 1H, 16 Hz, CH).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, TMS, ppm): δ = 13,8, 22,3, 29,0, 31,1, 32,6, 51,8, 111,4, 125,7, 165,8.

SM (IES) : m/z (%) : 197 ($[\text{M}+1]^+$), 219 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$).

IR (entre deux faces NaCl, cm^{-1}) : 2956, 2929, 2858, 2081, 1712, 1437.

2-hydroxy-2-(4-méthoxyphényl)acétate d'éthyle



FB $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_4$.

PM 210,23 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Aspect : huile incolore

A une solution de 104 mg de 2-diazo-2-(4-méthoxyphényl)acétate d'éthyle (0,47 mmoles) dans 4 mL de dichlorométhane anhydre sont additionnés 25,6 μL d'eau (1,42 mmoles) puis 2,9 mg de $[\text{RuCl}_2(p\text{-cym})]_2$ (4,7 μmoles) sous forme de solution dans 1 mL de dichlorométhane anhydre. Après 18 h. le milieu est évaporé puis le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant dichlorométhane/cyclohexane 80/20) pour fournir le produit attendu sous forme d'une huile incolore (82,1 mg, 83%).

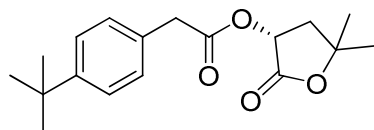
RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, TMS, ppm) : δ = 1,23 (t, 3H, 7,2 Hz, CH_3), 3,80 (s, 3H, CH_3), 4,11-4,29 (m, 2H, CH_2), 6,89 (d, 2H, 8,8 Hz, H_{ar}), 7,33 (d, 2H, 8,8 Hz, H_{ar}).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, TMS, ppm): δ = 14,0, 55,2, 62,0, 72,4, 113,9, 127,8, 130,6, 159,6, 173,8.

SM (IES) : m/z (%) : 233 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$).

IR (entre deux faces NaCl, cm^{-1}) : 3474, 2982, 1611, 1518, 1303, 1250, 1179.

(R)-5,5-diméthyl-2-oxotetrahydrofuran-3-yl 2-(4-*tert*-butylphényl)acétate



FB C₁₈H₂₄O₄.

PM 304,38 g·mol⁻¹.

Aspect : cristaux blancs

A une solution de 1,87 g (9,74 mmole) d'acide 4-*tert*-butyl-phénylacétique dans 40 mL de dichlorométhane distillé sont additionnés 2 g (9,69 mmole) de DCC et 122 mg (1 mmole) de DMAP suivies de 1,27 g (9,76 mmole) de pantolactone. Après une nuit, le solvant est évaporé à sec et le solide jaune obtenu est recristallisé dans de l'acétone pour fournir le produit attendu sous forme de cristaux blancs (1,57 g, 53%).

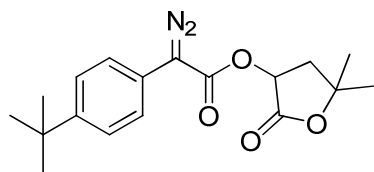
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz, TMS, ppm) : δ= 1,01 (s, 3H, CH₃ lactone), 1,13 (s, 3H, CH₃ lactone), 1,32 (s, 9H, tBu), 3,75 (d, 2H, 2,4 Hz, CH₂), 4,01 (d, 2H, 3,2 Hz, CH₂), 5,37 (s, 1H, CH lactone), 7,25 (d, 2H, 8,4 Hz, H_{ar}), 7,37 (d, 2H, 8 Hz, H_{ar}).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz, TMS, ppm) : δ= 19,7, 22,9, 31,2, 34,4, 40,2, 75,2, 76,1, 125,5, 128,9, 130,1, 150,2, 170,7, 172,2.

SM (IES) m/z: 305 [M+1], 631 [2M+23]; (IE, 70 eV): m/z(%): 41(15), 91(21), 117(36), 131(99), 132(40), 147(45), 159(70), 174(100), 175(27), 289(19), 304(19).

IR (pastille KBr, cm⁻¹) : 2966, 2910, 2875, 1793, 1748, 1518, 1467, 1415, 1401, 1369, 1332, 1299, 1270, 1223, 1198, 1150.

5,5-diméthyl-2-oxotetrahydrofuran-3-yl 2-(4-*tert*-butylphényl)-2-diazoacétate



FB C₁₈H₂₂N₂O₄.

PM 330,38 g·mol⁻¹.

Aspect : huile visqueuse orange

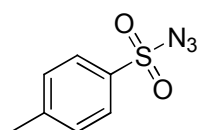
1,2 g (3,95 mmole) de l'ester de pantolactone synthétisé précédemment est solubilisé dans 5 mL d'acétonitrile anhydre. Le mélange est refroidi à 0°C et 830 µL (5,53 mmole) de DBU sont additionnés. Après 10 min. 1,1 g (5,58 mmole) de *para*-tosylazoture sont additionnés et le mélange est laissé revenir lentement à t.a. Après 12 h. le solvant est évaporé et le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant cyclohexane/acétate d'éthyle 90/10) pour fournir le produit attendu sous forme d'une huile orange (598 mg, 46%).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz, TMS, ppm) : δ= 1, 14 (s, 3H, CH₃ lactone), 1,27 (s, 3H, CH₃ lactone), 1,32 (s, 9H, tBu), 4,08 (d, 2H, 2,4 Hz, CH₂), 5,54 (s, 1H, CH lactone), 7,42 (d, 4H, 5,6 Hz, H_{ar}).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, TMS, ppm): $\delta = 19,8, 23,0, 75,1, 76,1, 121,3, 124,1, 126,0, 149,5, 163,9, 172,2$.

CLHP chirale (Chiralcel OD, Hexane/Ethanol 90/10 à 1 mL/min., UV 220 nm, 35°C) : t_{r1} 6,85 min, t_{r2} 7,93 min.

Azoture de 4-méthylbenzenesulfonyl¹⁶⁹



FB $\text{C}_7\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$.

PM 197,21 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Aspect : solide cristallin blanc

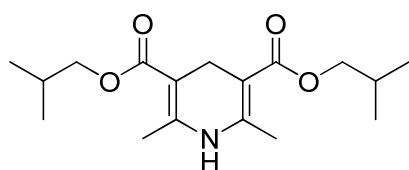
A une suspension d'azoture de sodium (14,30 g, 0,22 mole) dans 180 mL d'éthanol est additionnée une solution de chlorure de para-toluène sulfonyl (38,10 g, 0,2 mole) dans 160 mL d'acétone. Le mélange est laissé sous agitation une nuit puis le fin précipité blanc formé est filtré sur filtre Millipore® de porosité 5 μm . Le filtrat est évaporé, le résidu repris dans 40 mL d'eau distillée et extrait à l'acétate d'éthyle (2 x 200 mL). Les phases organiques réunies sont lavées avec une solution saturée de NaCl puis séchées sur du sulfate de sodium anhydre. Après évaporation du solvant sous pression réduite on récupère le produit (39,01 g, 99%) sous forme d'une huile incolore qui cristallise au congélateur.

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, TMS, ppm) : $\delta = 2,47$ (s, 3H, CH_3), 7,40 (d, 2H, 8 Hz, H_{Ar}), 7,82 (d, 2H, 8 Hz, H_{Ar}).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, TMS, ppm): $\delta = 21,7, 127,4, 130,2, 135,4, 146,2$.

SM (IE, 70 eV) : m/z (%) : 39(13), 51(8), 63(12), 64(7), 65(34), 89(10), 91(100), 92(14), 155(74), 156(8), 197(7).

Diisobutyl 2,6-diméthyl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate



FB $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{NO}_4$.

PM 309,40 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Aspect : solide jaune

¹⁶⁹ J. Waser, B. Gaspar, H. Nambu, E.M. Carreira, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 11693 (spectroscopie RMN et IR); Campbell, Dunn, *Org. Mass. Spectrom.* **1972**, 6, 599 (spectrométrie de masse).

Un mélange d'isobutyl acétoacétate (14 g, 81,29 mmole), d'acétate d'ammonium (3,16 g, 40,65 mmole) et de hexaméthylène tétraamine (5,70g, 40,65 mmole) est chauffé à 100°C pendant 20 min. Après l'apparition d'une coloration jaune orange, 20 mL d'eau sont additionnés et le milieu est extrait au dichlorométhane (3 x 75 mL). Les phases organiques réunies sont séchées sur sulfate de sodium anhydre et évaporées pour fournir un produit jaune, impur après contrôle par CCM. La purification par recristallisation dans de l'acétate d'éthyle fournit le produit pur sous forme de cristaux jaunes (6,25 g, 25%).

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, TMS, ppm) : δ = 0,95 (d , 12 H, 6,8 Hz, CH_3 de l'iBu), 1,95 (m, 2H, CH de l'iBu), 2,20 (s, 6H, CH_3), 3,31 (s, 2H, CH_2), 3,88 (d, 4H, 6,4 Hz, CH_2 de l'iBu), 5,18 (sl, 1H, NH).

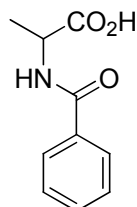
RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, TMS, ppm): δ = 18,7, 19,1, 24,8, 27,7, 69,8, 98,9, 145,6, 168,1.

IR (pastille KBr, cm^{-1}) : 3344, 2967, 2934, 2874, 1699, 1658, 1502, 1325, 1294, 1220, 1120, 1092, 1051, 1016.

Méthode générale pour la préparation des acides aminés *N*-benzoylés :

1 équivalent d'acide aminé est solubilisé dans une solution aqueuse 2M d'hydroxyde de sodium (0,85 mmole acide aminé / mL solution) puis 1 équivalent de chlorure de benzoyle est additionné au milieu en deux portions égales espacés de 10 minutes. Le milieu hétérogène devient dans le temps homogène. Après homogénéisation complète, le milieu est acidifié à pH 2-3 avec une solution aqueuse de HCl 1M ce qui entraîne la précipitation d'un produit blanc. Après deux heures le produit est extrait à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques réunies sont séchées sur du sulfate de sodium anhydre puis évaporées pour fournir le produit attendu. Celui-ci est purifié par CLHP préparative (colonne XBridge™ Prep C18 5 µm, éluant gradient eau/acétonitrile 95/5 -> eau/acétonitrile 5/95) pour fournir les acides aminés *N*-benzoylés de qualité analytique.

Acide 2-benzamidopropanoïque¹⁷⁰



FB C₁₀H₁₁NO₃.

PM 193,20 g·mol⁻¹.

Aspect : solide blanc

Rendement 81%.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz, TMS, ppm) : δ= 1,61 (d, 3H, 7,2 Hz, CH₃), 4,81 (dq, 1H, CH, 7,2 Hz, 7,2 Hz), 6,63 (sl, 1H, NH), 7,47 (t, 2H, 7,6 Hz, H_{ar}), 7,55 (t, 1H, 7,2 Hz, H_{ar}), 7,81 (d, 2H, 6,8 Hz, H_{ar}).

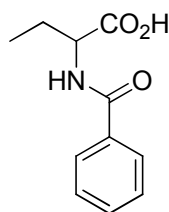
RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz, TMS, ppm): δ= 17,9, 48,6, 127,0, 128,6, 132,1, 133,1, 167,7.

SM (ESI+): m/z (%)= 192, (ESI-): m/z(%): 194.

CLHP chirale (Chiralpak AS, Hexane/Ethanol 80/20 à 1mL/min, UV 215 nm, 40°C): t_{r1} 10,79 min (*R*), t_{r2} 15,47 min (*S*).

¹⁷⁰ C.F. Fong, H.G. Hamish, *Aust. J. Chem.* **1981**, 34, 1869; D. Liotta, U. Sunay, H. Santiesteban, W. Markiewicz, J. *Org. Chem.* **1981**, 46, 2605 (spectroscopie RMN); S.S. Sandhu, N.S. Aulakh, *J. Indian Chem. Soc.* **1989**, 66, 530. (spectroscopie IR).

Acide 2-benzamidobutanoïque



FB C₁₁H₁₃NO₃.

PM 207,23 g·mol⁻¹.

Aspect : solide blanc

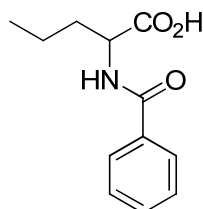
Rendement 80%.

RMN ¹H (MeOD, 400 MHz, TMS, ppm) : δ= 1,05 (t, 3H, 7,2 Hz, CH₃), 1,92-1,83 (m, 1H, H_{diastéréotopique}), 2,06-1,97 (m, 1H, H_{diastéréotopique}), 4,54-4,49 (m, 1H, CH), 7,47 (t, 2H, 7,2 Hz, H_{ar}), 7,85 (d, 2H, 7,6 Hz, H_{ar}), 8,02 (d, 1H, 8,0 Hz, H_{ar}).

SM (ESI+): m/z (%)= 208, (ESI-): m/z(%): 206; (IES) m/z : 230 ([M+Na⁺], 437 ([2M+Na⁺]), 644 ([3M+Na⁺]).

IR (pastille KBr, cm⁻¹) : 3307, 3134, 2968, 2939, 2879, 2677, 2550, 1746, 1689, 1618, 1537, 1341, 1297, 1273, 1184, 1131.

Acide 2-benzamidopentanoïque



FB C₁₂H₁₅NO₃.

PM 221,25 g·mol⁻¹.

Aspect : solide blanc

Rendement 91%.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz, TMS, ppm) : δ= 0,98 (t, 3H, 7,2 Hz, CH₃), 1,53-1,44 (m, 2H, CH₂), 1,87-1,80 (m, 1H, H_{diastéréotopique}), 2,05-1,97 (m, 1H, H_{diastéréotopique}), 4,82 (dd, 1H, 12,8 Hz, 7,2 Hz, CH), 6,64 (d, 1H, 7,2 Hz, NH), 7,46 (t, 2H, 7,2 Hz, H_{ar}), 7,54 (t, 1H, 7,2 Hz, H_{ar}), 7,81 (d, 1H, 7,2 Hz, H_{ar}).

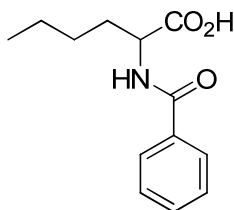
RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz, TMS, ppm): δ= 13,6, 18,6, 34,1, 52,5, 127,0, 128,6, 130,1, 132,0, 167,7, 175,1.

SM (ESI+): m/z (%)= 222, (ESI-): m/z(%): 220.

IR (pastille KBr, cm⁻¹) : 3244, 3061, 2959, 2874, 1721, 1635, 1538, 1492, 1328, 1271, 1246.

CLHP chirale (Chiralpak AD-H, Hexane/Ethanol 95/5 + TFA 0,1% à 1 mL/min., UV 220 nm, 35°C) : t_{r1} 22,10 min (R), t_{r2} 32,26 min (S).

Acide 2-benzamidohexanoïque



FB C₁₃H₁₇NO₃.

PM 235,28 g·mol⁻¹.

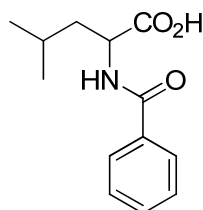
Aspect : solide blanc

Rendement 80%.

RMN ¹H (MeOD, 400 MHz, TMS, ppm) : δ= 0,94 (t, 3H, 7,2 Hz, CH₃), 1,48-1,37 (m, 4H, 2xCH₂), 1,87-1,82 (m, 1H, H_{diastéréotopique}), 2,02-1,94 (m, 1H, H_{diastéréotopique}), 4,58 (q, 1H, 5,2 Hz, CH), 7,47 (t, 2H, 7,2 Hz, H_{ar}), 7,55 (t, 1H, 7,2 Hz, H_{ar}), 7,85 (d, 2H, 7,2 Hz, H_{ar}).

SM (ESI+): m/z (%) = 234, (ESI-): m/z(%) : 236.

Acide 2-benzamido-4-méthylpentanoïque



FB C₁₃H₁₇NO₃.

PM 235,28 g·mol⁻¹.

Aspect : huile visqueuse incolore

Rendement 85%.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz, TMS, ppm) : δ= 1,00 (d, 6H, 5,2 Hz, CH₃), 1,70-1,86 (m, 3H, CH(iPr) + CH₂), 4,84 (dd, 1H, 5,2 Hz, 12,8 Hz, CH), 6,59 (d, 1H, 7,6 Hz, NH), 7,44 (t, 2H, 7,6 Hz, H_{ar}), 7,53 (t, 1H, 7,6 Hz, H_{ar}), 7,79 (d, 2H, 7,6 Hz, H_{ar}).

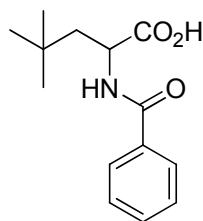
RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz, TMS, ppm): δ= 21,8, 22,8, 24,9, 41,1, 51,3, 127,1, 128,6, 131,9, 133,4, 168,1, 176,8.

SM (ESI+): m/z = 236, (ESI-) : m/z = 234.

IR (entre deux faces NaCl, cm⁻¹) : 3323, 3064, 2959, 2872, 1723, 1642, 1576, 1539, 1491, 1271, 1208, 1166.

CLHP chirale (Chiralpak AD-H, Hexane/Ethanol 85/15 + TFA 0,1% à 1 mL/min., UV 220 nm, 35°C) : t_{r1} 6,10 min (R), t_{r2} 6,96 min (S).

Acide 2-benzamido-4,4-diméthylpentanoïque



FB C₁₄H₁₉NO₃.

PM 249,31 g·mol⁻¹.

Aspect : solide blanc

Rendement 95%.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz, TMS, ppm) : δ= 1,03 (s, 9H, tBu), 1,65 (dd, 1H, 14,4 Hz, 9,2 Hz, H_{diastéréotopique}), 2,00 (dd, 1H, 14,4 Hz, 2,8 Hz, H_{diastéréotopique}), 4,82 (td, 1H, 9,2 Hz, 3,2 Hz, CH), 6,42 (d, 1H, 7,6 Hz, NH), 7,45 (t, 2H, 7,6 Hz, H_{ar}), 7,53 (t, 1H, 7,2 Hz, H_{ar}), 7,77 (d, 2H, 7,2 Hz).

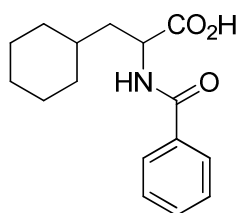
RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz, TMS, ppm): δ= 29,6, 30,7, 45,5, 69,1, 127,1, 128,5, 131,7, 133,6, 167,7.

SM (ESI⁺): m/z = 250, (ESI⁻) : m/z = 248.

IR (pastille KBr, cm⁻¹) : 3342, 3242, 3067, 2958, 2912, 2870, 2571, 2297, 1959, 1728, 1641, 1624, 1604, 1558, 1537, 1414, 1368, 1317, 1246, 1214, 1180, 1089.

CLHP chirale (Chiralpak AD-H, Hexane/Ethanol 90/10 + TFA 0,1% à 1 mL/min., UV 220 nm, 35°C) : t_{r1} 8,55 min (*R*), t_{r2} 9,44 min (*S*).

Acide 2-benzamido-3-cyclohexylpropanoïque



FB C₁₆H₂₁NO₃.

PM 275,34 g·mol⁻¹.

Aspect : solide blanc

Rendement 80%.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz, TMS, ppm) : δ= 0,94-1,03 (m, 2H, cyclohexyl), 1,13-1,27 (m, 2H, cyclohexyl), 1,45-1,48 (m, 1H, cyclohexyl), 1,64-1,78 (m, 4H, cyclohexyl), 1,85-1,91 (m, 2H, CH₂), 4,84 (dd, 1H, 14 Hz, 8 Hz, CH), 6,47 (d, 1H, 7,6 Hz, NH), 7,47 (t, 2H, 7,6 Hz), 7,55 (t, 1H, 7,2 Hz), 7,80 (d, 2H, 7,2 Hz).

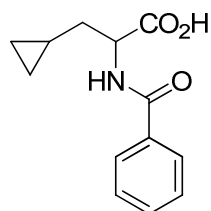
RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz, TMS, ppm): δ= 25,9, 26,0, 26,2, 32,5, 33,4, 34,2, 39,7, 50,7, 127,1, 128,6, 132,0, 133,5, 167,8, 176,7.

SM (ESI⁺): m/z = 276, (ESI⁻) : m/z = 274.

IR (pastille KBr, cm^{-1}) : 3344, 3064, 2923, 2850, 2668, 1971, 1907, 1710, 1640, 1603, 1579, 1521, 1488, 1447, 1319, 1293, 1261, 1240.

CLHP chirale (Chiralpak AD-H, Hexane/Ethanol 90/10 + TFA 0,1% à 1 mL/min., UV 220 nm, 35°C) : t_{r1} 9,85 min (*R*), t_{r2} 13,41 min (*S*).

Acide 2-benzamido-3-cyclopropylpropanoïque



FB $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NO}_3$.

PM 233,26 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Aspect : solide blanc

Rendement 81%.

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, TMS, ppm) : δ = 0,19 (d, 2H, 4 Hz, cyclopropyl), 0,53-0,55 (m, 2H, cyclopropyl), 0,81-0,84 (m, 1H, CH du cyclopropyl), 1,89-1,93 (m, 2H, CH_2), 4,88 (dd, 13,2 Hz, 6 Hz, CH), 6,83 (d, 1H, 6,8 Hz, NH), 7,47 (t, 2H, 8 Hz, H_{ar}), 7,53 (t, 1H, 7,2 Hz, H_{ar}), 7,81 (d, 2H, 7,2 Hz, H_{ar}).

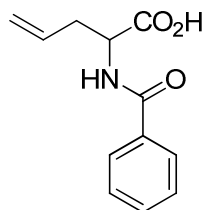
RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, TMS, ppm): δ = 4,2, 6,9, 53,2, 127,0, 128, 7, 132,0, 135,0, 174,8.

SM (ESI+): m/z = 234, (ESI-) : m/z = 232.

IR (pastille KBr, cm^{-1}) : 3509, 3323, 3078, 3004, 1954, 1908, 1716, 1663, 1643, 1522, 1310, 1296, 1281, 1241, 1210, 1174.

CLHP chirale (Chiralpak AD-H, Hexane/Ethanol 85/15 + TFA 0,1% à 1 mL/min., UV 220 nm, 35°C) : t_{r1} 7,97 min (*R*), t_{r2} 11,58 min (*S*).

Acide 2-benzamidopent-4-énoïque¹⁷¹



FB $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NO}_3$.

PM 219,24 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Aspect : solide jaunâtre

¹⁷¹ Q.B. Broxterman, B. Kaptein, J. Kamphuis, H.E. Schoemaker, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 6286 (spectroscopie RMN), Hurd, Bauer, *J. Org. Chem* **1953**, 18, 1440 (spectroscopie IR).

Rendement 87%.

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, TMS, ppm) : δ = 2,66-2,77 (m, 2H, CH_2), 4,85 (dd, 1H, 12,4 Hz, 6 Hz, CH), 5,17-5,22 (m, 2H, CH_2 allyl), 5,76-5,83 (m, 1H, CH allyl), 6,78 (d, 1H, 7,2 Hz, NH), 7,43 (t, 2H, 7,6 Hz, H_{ar}), 7,52 (t, 1H, 7,6 Hz, H_{ar}), 7,77 (d, 2H, 7,6 Hz, H_{ar}).

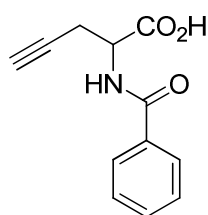
RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, TMS, ppm): δ = 36,0, 52,0, 119,7, 127,0, 128,6, 132,0, 133,3, 167,8, 175,0.

SM (ESI+): m/z = 220, (ESI-) : m/z = 218.

IR (entre deux faces NaCl, cm^{-1}) : 3329, 3068, 2983, 1966, 1730, 1643, 1604, 1576, 1538, 1490, 1441, 1417, 1344, 1268, 1227, 1160.

CLHP chirale (Chiralpak AD-H, Hexane/Ethanol 80/20 + TFA 0,1% à 1 mL/min., UV 220 nm, 35°C) : $t_{\text{r}1}$ 5,78 min (*R*), $t_{\text{r}2}$ 7,11 min (*S*).

Acide 2-benzamidopent-4-ynoïque¹⁷²



FB $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO}_3$.

PM 217,22 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Aspect : huile légèrement jaunâtre

Rendement 80%.

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, TMS, ppm) : δ = 2,11 (t, 1H, 2,4 Hz, CH propargyl), 2,96 (t, 2H, 2,4 Hz, CH_2), 4,95-5,00 (m, 1H, CH), 6,99 (d, 2H, 7,2 Hz, NH), 7,47 (t, 2H, 7,2 Hz, H_{ar}), 7,55 (t, 1H, 7,2 Hz), 7,83 (d, 2H, 7,2 Hz).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, TMS, ppm): δ = 22,2, 51,0, 71,9, 127,2, 128,6, 132,1, 133,2, 167,8, 173,4.

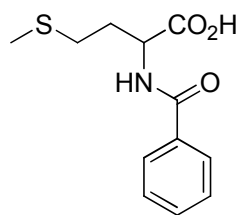
SM (ESI+): m/z = 218, (ESI-) : m/z = 216.

IR (entre deux faces NaCl, cm^{-1}) : 3297, 3063, 2601, 2122, 1968, 1912, 1807, 1737, 1642, 1604, 1577, 1530, 1489, 1429, 1343, 1267, 1220.

CLHP chirale (Chiralpak AD-H, Hexane/Ethanol 80/20 + TFA 0,1% à 1 mL/min., UV 220 nm, 35°C) : $t_{\text{r}1}$ 6,63 min (*R*), $t_{\text{r}2}$ 7,72 min (*S*).

¹⁷² M.J. Sofia, P.S. Chakravarty, J.A. Katzenellenbogen, *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 3318 (spectroscopie RMN, IR et de masse).

Acide 2-benzamido-4-(méthylthio)butanoïque



FB C₁₂H₁₅NO₃S.

PM 253,32 g·mol⁻¹.

Aspect : solide blanc

Rendement 92%.

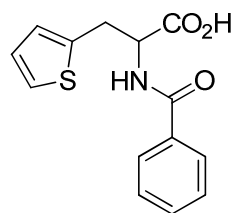
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz, TMS, ppm) : δ= 2,14 (s, 3H, Me), 2,18-2,24 (m, 1H, CH₂, H_{diastéréotopique}), 2,33-2,36 (m, 1H, CH₂, H_{diastéréotopique}), 2,68 (m, 2H, CH₂), 4,93 (dd, 1H, 7,2 Hz, 12,0 Hz, CH), 7,15 (d, 1H, 7,2 Hz, NH), 7,46 (t, 2H, 7,6 Hz, H_{ar}), 7,55 (t, 1H, 7,2 Hz, H_{ar}), 7,83 (d, 2H, 7,6 Hz, H_{ar}).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz, TMS, ppm) : δ= 15,4, 30,0, 30,7, 52,4, 127,1, 128,7, 132,1, 133,1, 168,0, 175,2.

SM (IE, 70 eV) : m/z (%) = 28(19), 51(16), 77(50), 104(8), 105(100), 106(10), 161(29), 174(41), 235(7).

IR (pastille KBr, cm⁻¹) : 3405, 3328, 2919, 2568, 1754, 1730, 1629, 1577, 1542, 1445, 1320, 1262, 1233, 1218, 1190, 1163.

Acide 2-benzamido-3-(thiophen-2-yl)propanoïque



FB C₁₄H₁₃NO₃.

PM 275,32 g·mol⁻¹.

Aspect : solide jaunâtre

Rendement 80%.

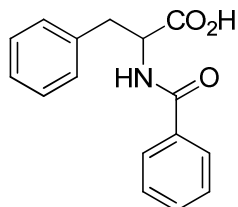
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz, TMS, ppm) : δ= 3,57 (dd, 2H, 4,8 Hz, 3,2 Hz, CH₂), 5,08-5,13 (m, 1H, CH), 6,74 (d, 1H, 6,8 Hz, NH), 6,88 (d, 1H, 2,8 Hz, H_{ar}), 6,96 (dd, 1H, 5,2 Hz, 3,2 Hz, H_{ar}), 7,20 (dd, 1H, 5,2 Hz, 0,8 Hz, H_{ar}), 7,45 (t, 2H, 7,2 Hz, H_{ar}), 7,54 (t, 1H, 7,2 Hz, H_{ar}), 7,77 (d, 2H, 7,2 Hz, H_{ar}).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz, TMS, ppm) : δ= 31,5, 53,0, 125,0, 127,0, 127,1, 128,7, 132,0, 133,0, 137,0, 167,5, 174,0.

SM (ESI⁺) : m/z = 276, (ESI⁻) : m/z : 274.

IR (entre deux faces NaCl, cm⁻¹) : 3326, 3067, 2598, 1965, 1729, 1639, 1576, 1529, 1488, 1436, 1342, 1245, 1212, 1160.

Acide 2-benzamidophénylpropanoïque



FB C₁₆H₁₅NO₃.

PM 269,30 g·mol⁻¹.

Aspect : solide blanc

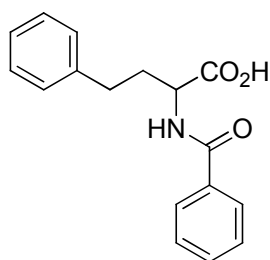
Rendement 82%.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz, TMS, ppm) : δ= 3,28 (dd, 1H, 14,0 Hz, 6,4 Hz, H_{diastéréotopique}), 3,39 (dd, 1H, 14 Hz, 5,6 Hz, H_{diastéréotopique}), 5,07 (dt, 1H, 7,2 Hz, CH), 6,50 (d, 1H, 6,8 Hz, NH), 7,35-7,21 (m, 5H, H_{ar}), 7,43 (t, 2H, 7,6 Hz, H_{ar}), 7,53 (t, 1H, 7,6 Hz, H_{ar}), 7,68 (d, 2H, 7,6 Hz, H_{ar}).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz, TMS, ppm): δ= 37,0, 53,6, 127,0, 127,4, 128,7, 128,8, 129,3, 132,1, 133,2, 135,5, 167,8, 173,6.

SM (ESI⁺): m/z (%)= 270, (ESI⁻): m/z(%): 268.

Acide 2-benzamido-4-phénylbutanoïque¹⁷³



FB C₁₇H₁₇NO₃.

PM 283,32 g·mol⁻¹.

Aspect : solide blanc

Rendement 80%.

RMN ¹H (MeOD, 400 MHz, TMS, ppm) : δ= 2,21-2,14 (m, 1H, H_{diastéréotopique}), 2,29-2,23 (m, 1H, H_{diastéréotopique}), 2,84-2,72 (m, 2H, CH₂), 4,57 (q, 1H, 4,8 Hz, CH), 7,29-7,15 (m, 5H, H_{ar}), 7,47 (t, 2H, 8,0 Hz, H_{ar}), 7,84 (d, 2H, 7,2 Hz, H_{ar}), 8,02 (d, 1H, 8 Hz, H_{ar}).

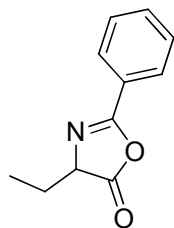
SM (ESI⁺): m/z (%)= 284, (ESI⁻): m/z(%): 282.

¹⁷³ D. Ben-Ishai et al., *Tetrahedron* **1977**, 33, 1533 (spectroscopie RMN et IR).

Méthode générale pour la préparation des oxazolones à partir des acides aminés *N*-benzoylés :

1 équivalent d'acide aminé *N*-benzoylé est solubilisé dans de l'anhydride acétique (1 mmole acide aminé *N*-benzoylé / 3,3 mL d'anhydride acétique). Le mélange est porté à 65°C pendant 2 heures puis l'anhydride acétique en excès est évaporé sous vide. Le produit obtenu est suffisamment pur pour servir comme substrat pour les réactions envisagées.

4-ethyl-2-phenyloxazol-5(4H)-one¹⁷⁴



FB C₁₁H₁₁NO₂.

PM 189,21 g·mol⁻¹.

Aspect : solide blanc

Rendement 90%.

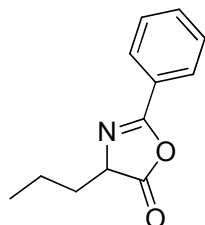
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz, TMS, ppm) : δ= 1,04 (t, 3H, 7,2 Hz, CH₃), 1,96-1,89 (m, 1H, H_{diastéréotopique}), 2,13-2,08 (m, 1H, H_{diastéréotopique}), 4,83 (dd, 1H, 13,2 Hz, 6,4 Hz, H_{asymétrique}), 6,71 (d, 7,2 Hz, NH), 7,52-7,46 (m, 2H, H_{Ar}), 7,82 (d, 2H, 7,2 Hz, H_{Ar}), 8,10 (d, 1H, 7,2 Hz, H_{Ar}).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz, TMS, ppm) : δ= 9,4, 24,8, 66,2, 127,8, 128,7, 130,5, 133,7, 167,5, 176,4.

SM (IE, 70 eV) : m/z (%) = 51(15), 77(44), 105(100), 130(25), 161(30), 189(12).

IR (entre deux faces NaCl, cm⁻¹) : 2972, 2936, 1721, 1644, 1603, 1577, 1535, 1489.

2-phényl-4-propyloxazol-5(4H)-one



FB C₁₂H₁₃NO₂.

PM 203,24 g·mol⁻¹.

Aspect : solide blanc

Rendement 91%.

¹⁷⁴ Boksiner, *J. Org. Chem. USSR* (Engl. Transl.) **1972**, 8, 609; Boksiner, *Zh. Org. Chem.* **1972**, 8, 604 (spectroscopie IR).

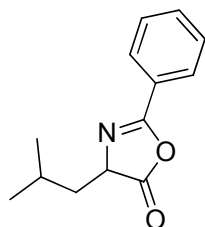
RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, TMS, ppm) : δ = 0,99 (t, 3H, 7,2 Hz, CH_3), 1,50-1,59 (m, 2H, CH_2), 1,82-1,88 (m, 1H, $\text{H}_{\text{diastéréotopique}}$), 1,96-2,03 (m, 1H, $\text{H}_{\text{diastéréotopique}}$), 4,42 (t(dd), 1H, 6 Hz, CH), 7,49 (t, 2H, 7,6 Hz, H_{ar}), 7,58 (t, 1H, 7,2 Hz, H_{ar}), 8,00 (d, 2H, 8 Hz, H_{ar}).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, TMS, ppm): δ = 13,6, 18,6, 33,5, 65,2, 125,9, 127,8, 128,7, 132,6, 161,5, 178,5.

SM (IE, 70 eV): m/z (%)= 77(53), 105(100), 147(36), 203(19).

IR (pastille KBr, cm^{-1}): 1819, 1654, 1324.

4-isobutyl-2-phenyloxazol-5(4H)-one



FB $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NO}_2$.

PM 217,26 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Aspect : solide blanc

Rendement 98%.

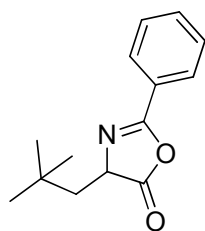
RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, TMS, ppm) : δ = 1,02 (“dd”, 6H, 20 Hz, 6,4 Hz, CH_3), 1,67-1,72 (m, 1H), 1,82-1,87 (m, 1H), 2,01-2,10 (m, 1H), 4,41 (dd, 1H, 9,2 Hz, 6 Hz, CH), 7,49 (t, 2H, 8 Hz, H_{ar}), 7,56 (t, 1H, 7,6 Hz, H_{ar}), 8,00 (d, 2H, 7,2 Hz, H_{ar}).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, TMS, ppm): δ = 31,4, 33,1, 64,4, 126,3, 127,9, 128,4, 128,5, 132,7, 140,1, 161,9, 178,5.

SM (IE, 70 eV): m/z (%)= 77(52), 105(100), 147(34), 161(31), 174(26), 217(17).

IR (entre deux faces NaCl, cm^{-1}): 2959, 2872, 1722, 1641, 1538.

4-neopentyl-2-phenyloxazol-5(4H)-one



FB $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{NO}_2$.

PM 231,29 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Aspect : solide blanc

Rendement quantitatif.

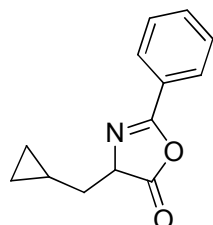
RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, TMS, ppm) : δ = 1,10 (s, 9H, tBu), 1,60 (dd, 1H, 14 Hz, 10 Hz, $\text{H}_{\text{diastéréotopique}}$), 1,95 (dd, 1H, 14 Hz, 3,2 Hz, $\text{H}_{\text{diastéréotopique}}$), 4,41 (dd, 1H, 10 Hz, 3,2 Hz, CH), 7,46 (t, 2H, 8 Hz, H_{ar}), 7,57 (t, 1H, 7,6 Hz, H_{ar}), 8,00 (d, 2H, 7,2 Hz, H_{ar}).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, TMS, ppm): δ = 29,6, 30,8, 45,7, 63,4, 126,1, 127,8, 128,7, 132,5, 160,8, 179,9.

SM (IE, 70 eV): m/z (%)= 77(56), 105(100), 147(42), 174(43), 231(27).

IR (entre deux faces NaCl, cm^{-1}) : 2956, 2908, 2870, 1825, 1653, 1322, 1295, 1240.

4-(cyclopropylméthyl)-2-phenyloxazol-5(4H)-one



FB $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{NO}_2$.

PM 215,25 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Aspect : solide blanc

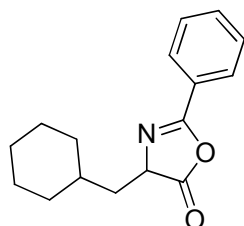
Rendement 90%.

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, TMS, ppm) : δ = 0,19-0,21 (m, 2H, cyclopropyl), 0,47-0,50 (m, 2H, cyclopropyl), 0,89-0,93 (m, 1H, CH du cyclopropyl), 1,73-1,80 (m, 1H, $\text{H}_{\text{diastéréotopique}}$), 2,02-2,10 (m, 1H, $\text{H}_{\text{diastéréotopique}}$), 4,45 (t(dd), 1H, 5,6 Hz, CH), 7,50 (t, 2H, 7,6 Hz, H_{ar}), 7,59 (t, 1H, 7,2 Hz, H_{ar}), 8,02 (d, 2H, 7,6 Hz, H_{ar}).

SM (IE, 70 eV): m/z (%)= 51(20), 55(89), 77(66), 105(100), 161(16), 186(20), 187(23), 215(16).

IR (pastille KBr, cm^{-1}): 1819, 1724, 1654, 1616, 1577, 1542, 1330, 1284, 1242, 1218.

4-(cyclohexylméthyl)-2-phenyloxazol-5(4H)-one



FB C₁₆H₁₉NO₂.

PM 257,33 g·mol⁻¹.

Aspect : solide blanc

Rendement 98%.

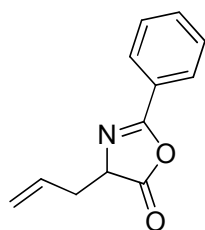
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz, TMS, ppm) : δ= 0,90-1,90 (m, 13H, cyclohexyl + CH₂), 4,45 (dd, 1H, 8,8 Hz, 5,6 Hz, CH), 7,49 (t, 2H, 7,6 Hz, H_{ar}), 7,58 (t, 1H, 7,2 Hz, H_{ar}), 8,01 (d, 2H, 7,2 Hz, H_{ar}).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz, TMS, ppm): δ= 32,6, 33,4, 34,2, 39,5, 63,3, 126,0, 127,8, 128,7, 132,6, 161,4, 179,1.

SM (IE, 70 eV): m/z (%)= 55(17), 77(48), 105(100), 147(54), 148(20), 161(22), 174(29), 257(24).

IR (entre deux faces NaCl, cm⁻¹) : 2923, 2851, 1828, 1721, 1653, 1449, 1322, 1296.

4-allyl-2-phenyloxazol-5(4H)-one



FB C₁₂H₁₁NO₂.

PM 201,22 g·mol⁻¹.

Aspect : solide blanc-jaune

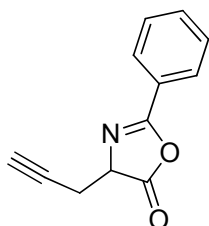
Rendement 91%.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz, TMS, ppm) : δ= 2,69-2,62 (m, 1H, H_{diastéréotopique}), 2,87-2,79 (m, 1H, H_{diastéréotopique}), 4,51 (t, 1H, 6 Hz, H_{asymétrique}), 5,17 (d, 1H, 10,4 Hz, CH₂ allyl), 5,25 (dd, 1H, 15,6 Hz, 3,6 Hz, CH₂ allyl), 5,85-5,75 (m, 1H, CH allyl), 7,49 (t, 2H, 8 Hz, H_{ar}), 7,59 (t, 1H, 7,6 Hz, H_{ar}), 8,00 (d, 2H, 7,2 Hz, H_{ar}).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz, TMS, ppm): δ= 35,3, 65,3, 119,8, 127,9, 128,7, 131,3, 132,8, 132,9, 162,0, 177,5.

SM (IE, 70 eV): m/z (%)= 51(12), 77(38), 105(100), 106(9), 160(14), 173(26), 201(6).

2-phenyl-4-(prop-2-ynyl)oxazol-5(4H)-one



FB C₁₂H₉NO₂.

PM 199,21 g·mol⁻¹.

Aspect : solide blanc-jaune

Rendement 96%.

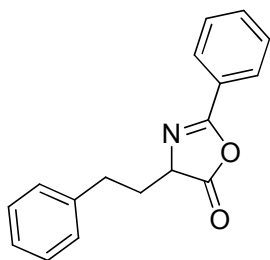
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz, TMS, ppm) : δ= 2,03 (t, 1H, 2,4 Hz, CH alkyne), 2,89 (ddd, 1H, 16,8 Hz, 5,2 Hz, 2,4 Hz, CH₂ H_{diastéréotopique}), 2,98 (ddd, 1H, 16,8 Hz, 5,2 Hz, 2,4 Hz, CH₂ H_{diastéréotopique}), 4,57 (t, 1H, 5,2 Hz, CH), 7,50 (m, 3H, H_{ar}), 8,03 (dd, 2H, 7,2 Hz, 1,2 Hz, H_{ar}).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz, TMS, ppm): δ= 21,5, 64,0, 71,7, 125,4, 128,0, 128,7, 133,0, 162,8, 176,5.

SM (IE, 70 eV): m/z (%)= 51(27), 52(6), 77(60), 105(100), 106(12), 128(8), 160(63), 161(8), 171(21), 199(5).

IR (entre deux faces NaCl, cm⁻¹): 3295, 1732, 1645, 1603, 1577, 1529, 1489, 1221.

4-phenethyl-2-phenyloxazol-5(4H)-one¹⁷⁵



FB C₁₇H₁₅NO₂.

PM 265,31 g·mol⁻¹.

Aspect : solide blanc

Rendement 90%.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz, TMS, ppm) : δ= 2,23-2,11 (m, 2H, CH₂), 2,39-2,29 (m, 2H, CH₂), 4,41 (dd, 1H, 7,6 Hz, 6 Hz, CH), 7,30-7,21 (m, 5H, H_{ar}), 7,43 (t, 2H, 7,2 Hz, H_{ar}), 7,51 (t, 2H, 7,2 Hz, H_{ar}), 8,02 (d, 2H, 7,2 Hz, H_{ar}).

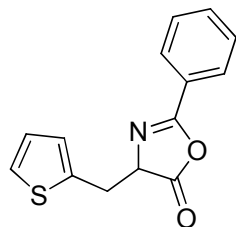
RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz, TMS, ppm): δ= 31,4, 33,1, 64,4, 126,3, 127,9, 128,4, 128,5, 132,7, 140,1, 161,9, 178,2.

SM (IE, 70 eV): m/z (%)= 77(40), 105(70), 161(100), 162(26), 265(2).

¹⁷⁵ M. Bernabe, *An. Quim.* **1972**, 68, 1005 (spectrométrie RMN, IR).

IR (pastille KBr, cm^{-1}): 1726, 1640, 1521.

2-phényl-4-(thiophen-2-ylmethyl)oxazol-5(4H)-one¹⁷⁶



FB $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{S}$.

PM 257,31 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Aspect : solide jaune

Rendement 90%.

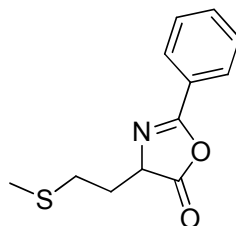
RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, TMS, ppm) : δ = 3,49 (dd, 1H, 15,2 Hz, 6,0 Hz, CH_2 $\text{H}_{\text{diastéréotopique}}$, 3,60 (dd, 1H, 15,2 Hz, 4,8 Hz, CH_2 , $\text{H}_{\text{diastéréotopique}}$), 4,71 (t, 1H, 5,6 Hz, CH), 6,90 (dd, 1H, 5,2 Hz, 3,6 Hz, H_{ar}), 6,93 (d, 1H, 2,8 Hz, H_{ar}), 7,13 (dd, 1H, 5,2 Hz, 0,8 Hz, H_{ar}), 7,48 (t, 2H, 8,0 Hz, H_{ar}), 7,58 (t, 1H, 7,6 Hz, H_{ar}), 7,97 (d, 2H, 7,6 Hz, H_{ar}).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, TMS, ppm): δ = 125,2, 126,8, 127,1, 127,2, 128,0, 128,7, 132,9, 136,2, 166,3, 174,0.

SM (IE, 70 eV): m/z (%) = 51(11), 77(32), 97(100), 98(11), 99(9), 105(19), 257(9).

IR (entre deux faces NaCl, cm^{-1}) : 2927, 1728, 1643, 1529, 1488.

4-(2-(méthylthio)éthyl)-2-phényloxazol-5(4H)-one¹⁷⁷



FB $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NO}_2\text{S}$.

PM 235,30 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Aspect : solide blanc

Rendement quantitatif.

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, TMS, ppm) : δ = 2,12 (s, 3H, CH_3), 2,30-3,00 (m, 4H, 2 x CH_2), 4,61 (t, 1H, 6,0 Hz, CH), 7,49 (t, 2H, 8,0 Hz, H_{ar}), 7,58 (t, 1H, 7,6 Hz, H_{ar}), 8,00 (d, 2H, 7,2 Hz, H_{ar}).

¹⁷⁶ K. Gottwald, D. Seebach, Tetrahedron, 1999, 55, 723 (spectroscopie RMN, IR et de masse).

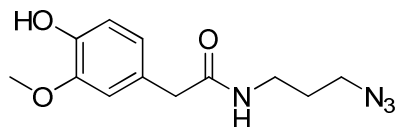
¹⁷⁷ G. Schulz, Chem. Ber. 1979, 112, 3221 (spectroscopie RMN et IR).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, TMS, ppm): δ = 15,1, 30,0, 30,3, 63,6, 128,0, 128,4, 128,5, 132,8, 162,1, 178,3.

SM (IE, 70 eV): m/z (%)= 77(52), 105(100), 161(49), 174(77), 235(18).

IR (pastille KBr, cm^{-1}): 1731, 1629, 1577, 1539, 1231, 1219, 1191, 1176.

N-(3-azidopropyl)-2-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)acétamide



FB C₁₂H₁₆N₄O₃.

PM 264,28 g·mol⁻¹.

Aspect : cristaux beiges

1 g d'acide homovanillique (5,47 mmole) et 0,8 mL de triéthylamine (5,75 mmole) sont solubilisées dans 10 mL de DMF. Ensuite une solution de 3-azidopropan-1-amine (19,94 g solution, c = 279 mg azoture/g solution; 5,56 g azoture, 5,55 mmole) dans le toluène est additionnée au milieu réactionnel suivie d'une solution de 2,073 g de HBTU (5,47 mmole) dans 10 mL de DMF. Agitation magnétique pendant la nuit puis le milieu réactionnel est évaporé à sec et le produit attendu est purifié par recristallisation dans l'acétone (747 mg, 52%).

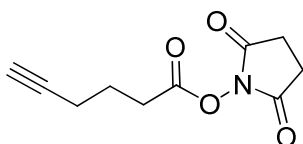
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz, TMS, ppm) : δ= 1,71 (quint, 2H, 6,8 Hz, CH₂-N₃), 3,28 ("q", 4H, 6,4 Hz, CH₂-CH₂), 3,49 (s, 2H, CH₂), 5,79 (sl, 1H, OH), 6,71 (dd, 1H, 8 Hz, 1,6 Hz, H_{ar}), 6,74 (d, 1H, 2 Hz, H_{ar}), 6,88 (d, 1H, 8 Hz, H_{ar}).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz, TMS, ppm): δ= 28,5, 37,3, 43,3, 49,3, 55,9, 111,8, 114,8, 122,2, 126,3, 145,0, 146,9, 171,8.

SM (IE, 70 eV): m/z(%): 28(18), 56(27), 94(15), 122(17), 137(100), 138(26), 164(30), 181(23), 264(16).

IR (pastille KBr, cm⁻¹) : 3334, 2938, 2098, 1637, 1595, 1555, 1518, 1448, 1387, 1363, 1258, 1224, 1154, 1125.

2,5-dioxopyrrolidin-1-yl hex-5-ynoate



FB C₁₀H₁₁NO₄.

PM 209,20 g·mol⁻¹.

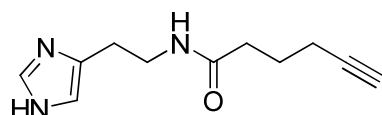
Aspect : solide blanc

A l'acide 5-hexynoïque (6,61 g, 56 mmole) sont additionnées, successivement une solution de N-hydroxysuccinimide (6,64 g, 56 mmole) dans 30 mL de THF et une solution de dicyclohexylcarbodiimide (11,53 g, 56 mmole) dans 30 mL de THF. Agitation magnétique pendant une nuit à t.a. Le précipité formé est filtré puis le filtrat est évaporé et purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant hexane/acétate d'éthyle 70/30) pour fournir le produit attendu sous forme d'un solide blanc (8,77 g, 75%)

RMN ¹H (Acétone D₆, 300 MHz, TMS, ppm) : δ= 1,94 (quint, 2H, 7,3 Hz, HCCH₂CH₂CH₂), 2,38 (dt, 2H, 7,3 Hz, 2,5 Hz, HCCH₂CH₂CH₂), 2,46 (t, 1H, 2,5 Hz, CH), 2,80 (t, 2H, 7,3 Hz, HCCH₂CH₂CH₂), 2,90 (s, 4H, H_{succinimide}).

SM (IES) m/z(%): 232 [M+Na]⁺.

N-(2-(1H-imidazol-4-yl)éthyl)hex-5-ynamide



FB C₁₁H₁₅N₃O.

PM 205,26 g·mol⁻¹.

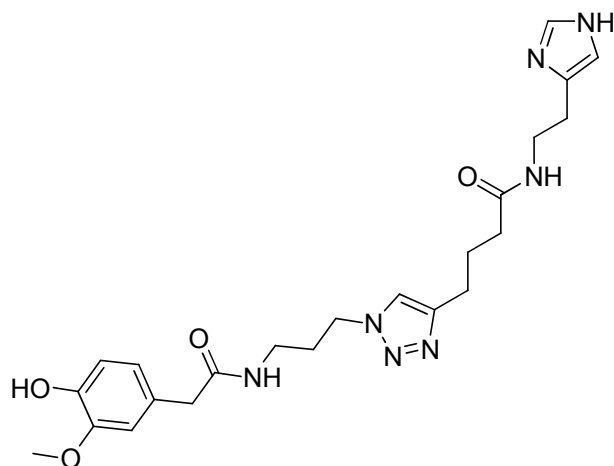
Aspect : solide blanc

2,91 g d'histamine (25,4 mmole) et 5,31 g de 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl hex-5-ynoate (25,4 mmole) sont solubilisés dans 30 mL de DMF. Après une nuit d'agitation magnétique à t.a. le milieu est évaporé à sec. Le résidu est repris dans un mélange DCM/méthanol 96/4 et le produit attendu précipite (2,75 g). Le reste du brut est chromatographié sur gel de silice (éluant DCM/méthanol 96/4) pour fournir un deuxième lot de produit pur, solide blanc (1,94 g). Rendement global 90%.

RMN ¹H (CD₃OD, 300 MHz, TMS, ppm) : δ= 1,76-1,67 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂), 2,15-2,09 (m, 2H, CH₂CONH), 2,26-2,19 (m, 2H, CH₂CCH), 2,61 (s, 1H, CH_{alcyne}), 2,72 (t, 2H, 7,3 Hz, CH₂CH₂NHCO), 3,37 (t, 2H, 7,3 Hz, CH₂CH₂NHCO), 6,82 (s, 1H, H_{ar}), 7,59 (s, 1H, H_{ar}).

SM (IES) m/z(%): 206 [M+1]⁺, 411 [2M+1]⁺.

N-(2-(1H-imidazol-4-yl)éthyl)-4-(1-(3-(2-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)acétamido)propyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)butanamide



FB C₂₃H₃₁N₇O₄.

PM 469,54 g·mol⁻¹.

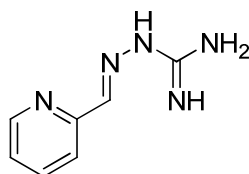
Aspect : huile jaunâtre

Dans un mélange d'eau (1 mL) et de *tert*-butanol (1 mL) sont solubilisés le *N*-(2-(1H-imidazol-4-yl)éthyl)hex-5-ynamide (34,6 mg, 169 μmole) et le *N*-(3-azidopropyl)-2-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)acétamide (50,2 mg, 190 μmole). Ensuite au milieu réactionnel sont additionnés 169 μL d'une solution 100M d'ascorbate de sodium (16,9 mmole) et 16,9 μL d'une solution 100M de sulfate de cuivre (II) pentahydrate (1,69 mmole). Le milieu est agité à 80°C pendant trois jours, puis le bon produit (12,7 mg, 16%) est obtenu par purification par chromatographie sur gel de silice (éluant DCM/méthanol 86/14).

RMN ¹H (MeOD, 300 MHz, TMS, ppm) : δ= 1,70-1,83 (m, 2H, CH₂), 1,90-2,03 (m, 2H, CH₂), 2,05-2,15 (m, 2H, CH₂), 2,45-2,58 (m, 2H, CH₂), 2,68-2,72 (t, 2H, 9,0 Hz, CH₂), 3,03-3,14 (m, 2H, CH₂), 3,29-3,40 (m, 4H, 2 x CH₂), 3,72 (s, 3H, CH₃), 4,12-4,25 (m, 2H, CH₂), 6,60 (s, 1H, H_{ar}), 6,76 (s, 1H, H_{ar}), 6,97 (s, 1H, H_{ar}), 7,52 (s, 1H, H_{ar}), 8,09 (s, 1H, H_{ar}).

SM (IES) m/z(%): 470 [M+1]⁺.

2-(pyridin-2-ylméthylène)hydrazinecarboximidamide



FB C₇H₉N₅.

PM 163,18 g·mol⁻¹.

Aspect : solide blanc verdâtre

L'aminoguanidine chlorhydrate (928 mg, 8,39 mmole) est solubilisée dans un minimum d'éthanol, puis la pyridine-2-carboxaldehyde (0,8 mL, 8,41 mmole) est ajoutée au milieu réactionnel. On porte à reflux puis une goutté d'acide sulfurique concentré est additionnée ce qui conduit à la coloration en jaune du milieu hétérogène. Le mélange est chauffé au reflux de l'éthanol pendant une nuit (la solution hétérogène devient verte) puis le solide est filtré sur fritté et lavé à l'éthanol glacé pour fournir 264 mg (19%) d'un solide blanc verdâtre.

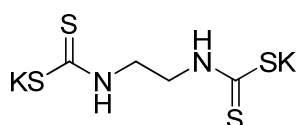
RMN ^1H (D_2O , 400 MHz, TMS, ppm) : δ = 7,78 (t, 1H, 6,4 Hz, H_{Ar}), 8,01 (d, 1H, 8 Hz, H_{Ar}), 8,12 (s, 1H, CH), 8,30 (td, 1H, 8Hz, 1,2 Hz, H_{Ar}), 8,65 (d, 1H, 5,2 Hz, H_{Ar}).

RMN ^{13}C (D_2O , 100 MHz, TMS, ppm): δ = 125,3, 126,6, 140,6, 143,7, 145,0, 146,2, 155,2.

SM (ESI+) m/z : 164 ($\text{M}+\text{H}^+$).

IR (pastille KBr, cm^{-1}) : 3092, 2860, 2787, 1701, 1615, 1152, 1081.

Ethane-1,2-diylldicarbamodithioate de potassium



FB $\text{C}_4\text{H}_6\text{K}_2\text{N}_2\text{S}_4$.

PM 288,56 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Aspect : solide jaune

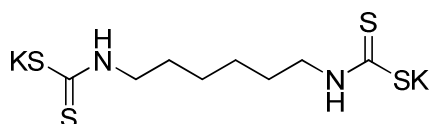
L'ethylènediamine (2 mL, 30 mmole) et le KOH (à 85%, 4 g, 60 mmole) sont solubilisés dans 65 mL d'éthanol à 0°C. Après solubilisation complète, le disulfure de carbone (4,5 mL, 75 mmole) est ajouté ce qui entraîne la formation d'un précipité jaune. Après une heure le produit attendu est isolé par filtration sous forme d'un solide jaune (7,339 g, 85%).

RMN ^1H (D_2O , 400 MHz, TMS, ppm) : δ = 3,79 (s, 4H).

RMN ^{13}C (D_2O , 100 MHz, TMS, ppm): δ = 44,6, 46,4, 211,9.

SM (ESI+) m/z : 213 ($\text{M}+\text{H}^+$, forme diprotonée)

Hexane-1,6-diylldicarbamodithioate de potassium



FB $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{K}_2\text{N}_2\text{S}_4$.

PM 344,67 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Aspect : solide blanc

La 1,6-hexanediamine (2 g, 17,21 mmole) est solubilisée dans 35 mL d'éthanol. A la solution résultante refroidie à 0°C par un bain de glace 2,27 g de KOH (à 85%, 34,38 mmole) sont additionnés, puis 2,6 mL de disulfure de carbone (43,23 mmole). Après retour à t.a. le produit précipité est récupéré par filtration (3,49g, 59%, solide blanc).

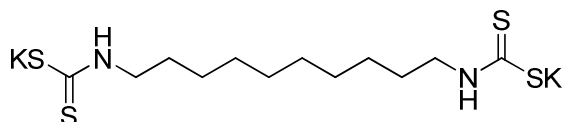
RMN ^1H (D_2O , 400 MHz, TMS, ppm) : δ = 1,5-1,3 (m, 4H), 1,7-1,6 (m, 4H), 3,54 (t, 4H, 7,2 Hz).

RMN ^{13}C (D_2O , 100 MHz, TMS, ppm): $\delta = 25,7, 27,5, 47,9, 209,6$.

SM (ESI+) m/z : 269 ($\text{M}+\text{H}^+$, forme diprotonée).

IR (pastille KBr, cm^{-1}) : 3271, 2929, 2855, 1486, 1083, 940.

Decane-1,10-diylldicarbamodithioate de potassium



FB $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{K}_2\text{N}_2\text{S}_4$.

PM $400,77 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Aspect : solide blanc

La 1,10-decanediamine (2 g, 13,86 mmole) est solubilisée dans 35 mL d'éthanol. A la solution résultante refroidie à 0°C par un bain de glace 1,53 g de KOH (à 85%, 23,18 mmole) sont additionnés, puis 1,75 mL de disulfure de carbone (29,09 mmole). Après retour à t.a. le produit précipité est récupéré par filtration (3,457g, 62%, solide blanc).

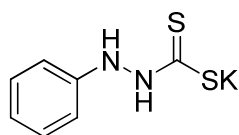
RMN ^1H (D_2O , 400 MHz, TMS, ppm) : $\delta = 1,4-1,3$ (m, 12H), 1,64-1,6 (m, 4H), 3,52 (t, 4H, 7,2 Hz).

RMN ^{13}C (D_2O , 100 MHz, TMS, ppm): $\delta = 26,0, 27,6, 28,3, 28,5, 48,1, 209,5$.

SM (ESI+) m/z : 325 ($\text{M}+\text{H}^+$, forme diprotonée).

IR (pastille KBr, cm^{-1}) : 3268, 2921, 2851, 1485, 938.

2-phénylhydrazinecarbodithioate de potassium



FB $\text{C}_7\text{H}_7\text{KN}_2\text{S}_4$.

PM $222,37 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Aspect : solide blanc-jaunâtre

La phénylhydrazine (2 mL, 20,33 mmole) est solubilisée dans 35 mL d'éthanol. A la solution résultante refroidie à 0°C par un bain de glace 2,98 g de KOH (à 85%, 45,15 mmole) sont additionnés puis 3 mL de disulfure de carbone (49,88 mmole). Après retour à t.a. le produit précipité est récupéré par filtration (3,750 g, 83%, solide blanc-jaunâtre).

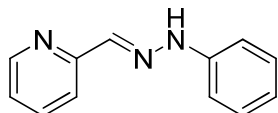
RMN ^1H (D_2O , 400 MHz, TMS, ppm) : $\delta = 6,92$ (d, 2H, 7,6 Hz, H_{Ar}), 7,01 (t, 1H, 7,6 Hz, H_{Ar}), 7,36 (t, 2H, 7,6 Hz, H_{Ar}).

RMN ^{13}C (D_2O , 100 MHz, TMS, ppm): $\delta = 113,7, 121,2, 129,4, 147,0, 213,4$.

SM (ESI+) m/z : 185 ($\text{M}+\text{H}^+$, forme protonée).

IR (pastille KBr, cm^{-1}) : 3390, 1599, 1493, 1139, 996.

(2-((2-phénylhydrazono)méthyl)pyridine



FB $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_3$.

PM 197,24 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Aspect : solide jaune

La phénylhydrazine (827 μL , 8,41 mmole) est ajoutée goutte à goutte sur la pyridine-2-carboxaldéhyde (800 μL , 8,41 mmole). La réaction est immédiate et violente. Le solide jaune obtenu (1,322 g, 80%) est lavé à l'éthanol et à l'éther.

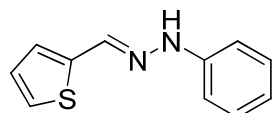
RMN ^1H (Acétone- D_6 , 400 MHz, TMS, ppm) : $\delta = 6,83$ (t, 1H, 7,2 Hz, H_{Ar}), 7,28-7,18 (m, 5H, H_{Ar}), 7,76 (t, 1H, 7,2 Hz, H_{Ar}), 7,91 (s, 1H, CH), 8,02 (d, 1H, 8 Hz, H_{Ar}), 8,50 (d, 1H, 4,8 Hz, H_{Ar}), 9,82 (sl, 1H, NH).

RMN ^{13}C (Acétone- D_6 , 100 MHz, TMS, ppm): $\delta = 112,4, 118,6, 119,7, 122,2, 129,0, 136,0, 137,3, 145,0, 149,1, 155,2$.

SM (ESI+) m/z : 198 ($\text{M}+\text{H}^+$).

IR (pastille KBr, cm^{-1}) : 3225, 3185, 3127, 3058, 3024, 3004, 2948, 2893, 1605, 1568, 1494, 1466, 1434, 1355, 1272, 1250, 1149, 1089, 996.

1-phényl-2-(thiophen-2-ylméthylène)hydrazine



FB $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{S}$.

PM 202,28 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Aspect : solide jaune

La phénylhydrazine (842 μL , 8,56 mmole) est ajoutée goutte à goutte sur la pyridine-2-carboxaldéhyde (800 μL , 8,56 mmole). La réaction est immédiate et violente. Le solide jaune obtenu (1,528 g, 88%) est lavé à l'éthanol et à l'éther.

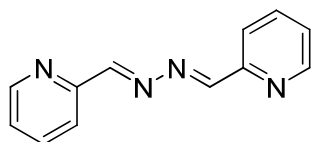
RMN ^1H (Acétone- D_6 , 400 MHz, TMS, ppm) : δ = 6,77 (t, 1H, 7,2 Hz, H_{Ar}), 7,03 (t, 1H, 4,8 Hz, H_{Ar}), 7,08 (d, 2H, 8 Hz, H_{Ar}), 7,15 (d, 1H, 3,6 Hz, H_{Ar}), 7,22 (t, 2H, 8 Hz, H_{Ar}), 7,37 (d, 1H, 4,8 Hz, H_{Ar}), 8,08 (s, 1H, CH), 9,41 (sl, 1H, NH).

RMN ^{13}C (Acétone- D_6 , 100 MHz, TMS, ppm): δ = 112,2, 119,1, 125,3, 126,2, 127,2, 129,0, 132,0, 141,3, 145,3.

SM (ESI+) m/z : 203 ($\text{M}+\text{H}^+$).

IR (pastille KBr, cm^{-1}): 3325, 1603, 1535, 1506, 1448, 1297, 1264, 1235, 1215, 1137.

1,2-bis(pyridin-2-ylméthylène)hydrazine



FB $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_4$.

PM 210,23 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Aspect : solide jaune

A la pyridine-2-carboxaldehyde (1,55 mL, 16,3 mmole) est additionnée, goutte à goutte, sous agitation, l'hydrazine hydrate (250 μL , degré d'hydratation 1,5, 4,36 mmole). La réaction est rapide, après quelques secondes le milieu devient trouble et après une minute le milieu devient solide. Le solide cristallin jaune (667 mg, 73%) est filtré sur fritté et lavé à l'éthanol glacé.

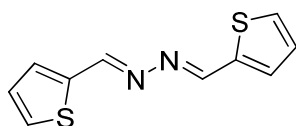
RMN ^1H (Acétone- D_6 , 400 MHz, TMS, ppm) : δ = 7,50 (dd, 2H, 7,2 Hz, 5,2 Hz, H_{Ar}), 7,94 (td, 2H, 8Hz, 1,2 Hz, H_{Ar}), 8,20 (d, 2H, 8 Hz, H_{Ar}), 8,58 (s, 2H, CH), 8,72 (d, 2H, 4,8 Hz, H_{Ar}).

RMN ^{13}C (Acétone- D_6 , 100 MHz, TMS, ppm): δ = 121,3, 125,3, 136,6, 149,9, 152,9, 161,9.

SM (ESI+) m/z : 211 ($\text{M}+\text{H}^+$).

IR (pastille KBr, cm^{-1}): 3079, 3052, 3004, 2958, 1630, 1584, 1563, 1464, 1433, 1219.

1,2-bis(thiophen-2-ylméthylène)hydrazine



FB $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2\text{S}_2$.

PM 220,31 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Aspect : solide jaune

A la thiophène-2-carboxaldehyde (1,5 mL, 16,05 mmole) est additionnée, goutte à goutte, sous agitation, l'hydrazine hydrate (250 μL , degré d'hydratation 1,5, 4,36 mmole). La réaction

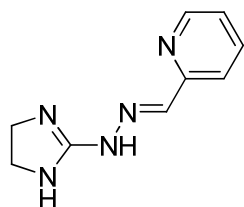
est rapide, après approximativement 1 minute le milieu devient trouble et après 15 minutes on observe la formation d'un précipité jaune. Le solide jaune (498 mg, 52%) est filtré sur fritté et lavé à l'éthanol glacé.

RMN ^1H (Acétone- D_6 , 400 MHz, TMS, ppm) : δ = 7,20 (dd, 2H, 5,2 Hz, 3,6 Hz, H_{Ar}), 7,60 (d, 2H, 8Hz, 3,2 Hz, H_{Ar}), 7,70 (d, 2H, 5,2 Hz, H_{Ar}), 8,80 (s, 2H, CH).

RMN ^{13}C (Acétone- D_6 , 100 MHz, TMS, ppm): δ = 127,9, 130,2, 133,0, 139,1, 155,5.

IR (pastille KBr, cm^{-1}) : 3100, 3083, 1608, 1419, 1209, 1039, 948.

2-((2-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl)hydrazono)methyl)pyridine



FB $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_5$.

PM 189,22 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Aspect : solide jaune

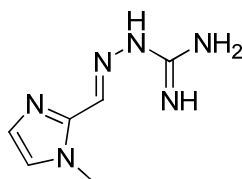
L'imidazoline-2-hydrazine bromhydrate (450 mg, 2,49 mmole) est solubilisée dans un mélange formé de 10 mL d'éthanol et 3 mL d'eau puis la pyridine-2-carboxaldéhyde est ajoutée sous agitation suivie de 3 gouttes d'acide sulfurique concentré. Après 4 heures, le précipité formé est filtré, lavé à l'éthanol pour fournir le produit attendu sous forme d'un solide jaune (403 mg, 86%).

RMN ^1H (D_2O , 400 MHz, TMS, ppm) : δ = 3,90 (s, 4H, CH_2), 7,98 (t, 1H, 7,2 Hz, H_{Ar}), 8,19 (d, 1H, 8Hz, H_{Ar}), 8,28 (s, 1H, CH), 8,54 (dt, 1H, 8 Hz, 1,2 Hz, H_{Ar}), 8,79 (d, 1H, 5,2 Hz, H_{Ar}).

RMN ^{13}C (D_2O , 100 MHz, TMS, ppm): δ = 43,1, 126,3, 127,2, 138,6, 142,9, 144,9, 146,6, 158,1.

IR (pastille KBr, cm^{-1}) : 3490, 3391, 3148, 3072, 3046, 2648, 1649, 1618, 1578, 1454, 1287, 1117, 1072, 924.

2-((1-méthyl-1H-imidazol-2-yl)méthylène)hydrazinecarboximidamide



FB $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{N}_6$.

PM 166,18 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Aspect : solide jaune

A la solution de chlorhydrate d'aminoguanidine (345 mg, 3,12 mmole) dans 5 mL d'eau est ajoutée goutte à goutte une solution de 1-méthylimidazole-2-carboxaldéhyde (500 mg, 3,12 mmole) dans 5 mL d'éthanol, puis 3 gouttes d'acide sulfurique concentré sont ajoutées au milieu

réactionnel. Après approximativement une heure le précipité formé est filtré et lavé à l'éthanol pour fournir le produit attendu sous forme d'un solide blanc (117 mg, 23%).

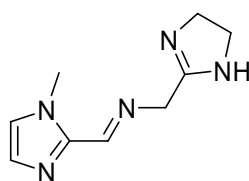
RMN ^1H (D_2O , 400 MHz, TMS, ppm) : δ = 3,97 (s, 3H, CH_3), 7,48 (s, 2H, H_{Ar}), 8,24 (s, 1H, CH).

RMN ^{13}C (D_2O , 100 MHz, TMS, ppm): δ = 34,6, 122,2, 125,2, 131,3, 139,1, 155,3.

SM (ESI+) m/z : 167 ($\text{M}+\text{H}^+$)

IR (pastille KBr, cm^{-1}) : 3282, 3137, 2634, 1699, 1630, 1603, 1139, 1072.

1-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl)-N-((1-méthyl-1H-imidazol-2-yl)méthylène)méthanamine



FB $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_5$.

PM 191,23 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Aspect : solide blanc

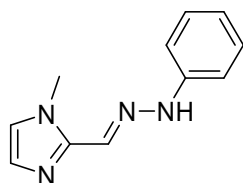
A la solution de 2-hydrazine-imidazoline bromhydrate (226 mg, 1,25 mmole) dans 2 mL d'eau est additionnée une solution de 1-méthylimidazole-2-carboxaldehyde (200 mg, 1,25 mmole) dans 2 mL d'éthanol. Après l'ajout de 2 gouttes d'acide sulfurique concentré au milieu réactionnel, après une heure on observe la formation d'un précipité blanc. Après une nuit à t.a., le précipité est filtré et lavé à l'éthanol pour fournir le produit attendu sous forme d'un solide blanc (187 mg, 78%).

RMN ^1H (D_2O , 400 MHz, TMS, ppm) : δ = 3,89 (s, 4H, CH_2), 3,99 (s, 3H, CH_3), 7,52 (d, 2H, 4 Hz, H_{Ar}), 8,25 (s, 1H, CH).

RMN ^{13}C (D_2O , 100 MHz, TMS, ppm): δ = 16,7, 35,1, 43,0, 57,3, 120,2, 125,2, 130,7, 138,2, 158,0.

SM (ESI+) m/z : 193 ($\text{M}+2\text{H}^+$)

1-méthyl-2-((2-phenylhydrazono)méthyl)-1H-imidazole



FB $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_4$.

PM 200,24 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Aspect : solide blanc jaunâtre

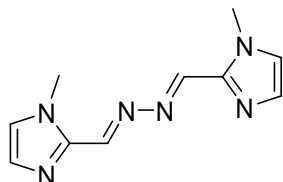
Après la solubilisation du 1-méthylimidazole-2-carboxaldéhyde (530 mg, 4,8 mmole) dans 5 mL d'éthanol, la phénylhydrazine 500 μ L, 5,08 mmole) est additionnée, suivie de deux gouttes d'acide sulfurique concentré. Après 15 minutes, le précipité formé est récupéré par filtration, puis lavé à l'éthanol pour fournir le produit attendu sous forme d'un solide blanc jaunâtre (201 mg, 21%).

RMN ^1H (D_2O , 400 MHz, TMS, ppm) : δ = 3,83 (s, 3H, CH_3), 6,94-7,06 (m, 1H, H_{ar}), 7,13 (d, 2H, 7,6 Hz, H_{ar}), 7,24-7,31 (m, 4H, H_{ar}), 7,65 (s, 1H, CH).

SM (ESI+) m/z : 201 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

IR (pastille KBr, cm^{-1}): 3232, 3126, 3045, 3002, 2953, 1595, 1554, 1494, 1460, 1291, 1268, 1225, 1183, 1128.

1,2-bis((1-méthyl-1H-imidazol-2-yl)méthylène)hydrazine



FB $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_6$.

PM 216,27 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

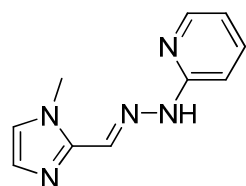
Aspect : solide blanc

Le 1-méthyl-imidazole-2-carboxaldéhyde (408 mg, 3,7 mmole) est solubilisé dans 2 mL d'éthanol puis l'hydrazine (degré d'hydratation 1,5, 175 μ L, 3,05 mmole) est additionné suivie de deux gouttes d'acide sulfurique concentré. Après 15 minutes on observe la formation d'un précipité qui est isolé par filtration ensuite lavé à l'éthanol pour fournir le produit attendu sous forme d'un solide blanc 225 mg, 28%).

RMN ^1H (MeOD, 400 MHz, TMS, ppm) : δ = 4,04 (s, 6H, CH_3), 7,21 (s, 2H, H_{Ar}), 7,33 (s, 2H, H_{Ar}), 8,63 (s, 2H, CH).

RMN ^{13}C (MeOD, 100 MHz, TMS, ppm): δ = 34,9, 126,4, 129,3, 141,0, 153,1.

2-(2-((1-méthyl-1H-imidazol-2-yl)méthylène)hydrazinyl)pyridine



FB $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_5$.

PM 201,23 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Aspect : solide jaune

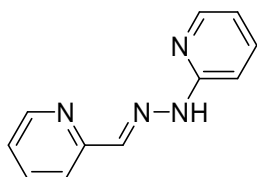
Le 1-méthyl-imidazole-2-carboxaldéhyde (250 mg, 2,27 mmole) est solubilisé dans 3 mL d'éthanol puis une solution de pyridine-2-hydrazine (240 mg, 2,20 mmole) dans 2,5 mL d'éthanol est ajoutée, suivie de 5 gouttes d'acide sulfurique concentré. Après la formation d'un

précipité jaune, le produit attendu est isolé par filtration suivie de lavage à l'éthanol. Solide jaune (558 mg, quantitatif).

RMN ^1H (D_2O , 400 MHz, TMS, ppm) : δ = 4,03 (s, 3H, CH_3), 7,33 (t, 1H, 7,2 Hz, H_{Ar}), 7,40 (d, 1H, 8,8 Hz, H_{Ar}), 7,55 (s, 1H, H_{Ar}), 7,60 (s, 1H, H_{Ar}), 8,25-8,24 (m, 2H, H_{Ar}), 8,34 (s, 1H, CH).

RMN ^{13}C (D_2O , 100 MHz, TMS, ppm): δ = 34,7, 112,5, 117,2, 120,2, 125,0, 128,4, 136,8, 146,1.

2-((2-(pyridin-2-yl)hydrazono)méthyl)pyridine



FB $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_4$.

PM 198,22 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

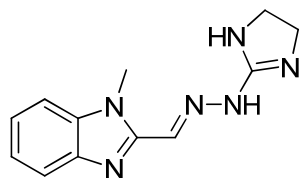
Aspect : solide jaune

A la solution de pyridine-2-hydrazine (133 mg, 1,21 mmole) dans 1 mL d'éthanol on ajoute la pyridine-2-carboxaldéhyde, puis 3 gouttes d'acide sulfurique concentré. Le précipité jaune formé est filtré et lavé à l'éthanol pour fournir le produit attendu sous forme d'un solide jaune (202 mg, 84%).

RMN ^1H (D_2O , 400 MHz, TMS, ppm) : δ = 7,34 (t, 1H, 6,8 Hz, H_{Ar}), 7,39 (d, 1H, 8,8 Hz, H_{Ar}), 8,03 (t, 1H, 6,8 Hz, H_{Ar}), 8,29-8,24 (m, 3H, H_{Ar}), 8,36 (s, 1H, CH), 8,62 (t, 1H, 8 Hz, H_{Ar}), 8,87 (d, 1H, 6 Hz, H_{Ar}).

RMN ^{13}C (D_2O , 100 MHz, TMS, ppm): δ = 112,6, 117,3, 126,9, 127,1, 136,1, 136,9, 142,4, 144,7, 146,2, 147,5, 149,0.

2-((2-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl)hydrazono)méthyl)-1-méthyl-1H-benzo[d]imidazole



FB $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_6$.

PM 242,28 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Aspect : solide jaune

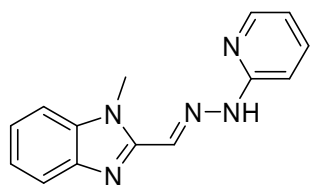
Le 1-méthyl-benzimidazole-2-carboxaldéhyde (150 mg, 0,94 mmole) est solubilisé dans 5 mL d'éthanol à 50°C. Ensuite une solution de 2-hydrazino-2-imidazoline (170 mg, 0,94 mmole) dans 4 mL d'éthanol est additionnée suivie de 3 gouttes d'acide sulfurique concentré. Le mélange est porté à reflux et agité pendant une heure. Le précipité formé est filtré et lavé à l'éthanol. Le produit attendu est obtenu sous forme d'un solide jaune (267 mg, quantitatif).

RMN ^1H (DMSO- D_6 , 400 MHz, TMS, ppm) : δ = 3.80 (s, 3H, CH_3), 4.11 (s, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 7.38 (t, 1H, 7.6 Hz, H_{Ar}), 7.45 (t, 1H, 7.6 Hz, H_{Ar}), 7.76 (d, 1H, 8 Hz, H_{Ar}), 7.79 (d, 1H, 8Hz, H_{Ar}), 8.39 (s, 1H, CH), 8.78 (sl, 1H, NH).

RMN ^{13}C (DMSO- D_6 , 100 MHz, TMS, ppm): δ = 32,7, 43,3, 112,3, 117,8, 125,6, 135,7, 145,3, 158,2.

SM (ESI+) m/z : 243 ($[\text{M}+\text{H}]^+$); (ESI-) m/z : 241 ($[\text{M}-\text{H}]^+$).

1-méthyl-2-((2-(pyridin-2-yl)hydrazono)méthyl)-1H-benzo[d]imidazole



FB $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_5$.

PM 251,29 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

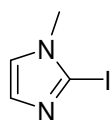
Aspect : solide jaune-orange

A une solution de 1-méthyl-benzimidazole-2-carboxaldéhyde (150 mg, 0,94 mmole) dans 4 mL d'éthanol sont additionnées successivement, une solution de pyridine-2-hydrazine (100 mg, 0,92 mmole), dans 3 mL, d'éthanol et 5 gouttes d'acide sulfurique concentré. Le précipité très fin formé est filtré et lavé à l'éthanol pour fournir le produit attendu sous forme d'un solide jaune-orange (210 mg, 91%).

RMN ^1H (D_2O , 400 MHz, TMS, ppm) : δ = 4,18 (s, 3H, CH_3), 7,39 (t, 1H, 6,8 Hz, H_{ar}), 7,44 (d, 1H, 8,8 Hz, H_{ar}), 7,66-7,69 (m, 2H, H_{ar}), 7,83-7,90 (m, 2H, H_{ar}), 8,26-8,34 (m, 2H, H_{ar}), 8,52 (s, 1H, CH).

SM (ESI+) m/z : 252 ($[\text{M}+\text{H}]^+$); (ESI-) m/z : 250 ($[\text{M}-\text{H}]^+$).

2-iodo-1-méthyl-1H-imidazole¹⁷⁸



FB $\text{C}_4\text{H}_5\text{IN}_2$.

PM 208,00 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Aspect : solide jaune-orange

A une solution de 1-méthyl-imidazole (2 mL, 25,1 mmole) dans 100 mL de THF anhydre est additionnée, goutte à goutte, à -78°C , pendant 20 minutes, une solution de méthyl-lithium (solution 1,6 M dans l'éther, 16 mL, 25,6 mmole), puis le milieu réactionnel est chauffé à -30°C et laissé évoluer pendant 30 minutes. Ensuite une solution d'iode (6,37 g, 25,1 mmole) dans 6 mL de THF est additionnée au milieu goutte à goutte. La solution initialement incolore se colore

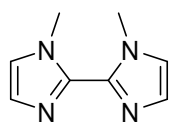
¹⁷⁸ S.B. Park, H. Alper, *Chem. Commun.* **2004**, 1306 (spectroscopie de RMN).

lentement en violet. Le milieu est laissé remonter à t.a. puis après deux heures 50 mL d'une solution aqueuse saturée en thiosulfate de sodium est ajoutée au milieu. La solution résultante est extraite au dichlorométhane (3 x 100 mL), puis les phases organiques réunies sont séchées sur sulfate de magnésium anhydre. Après évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu est purifié par chromatographie sur colonne. Le produit attendu est obtenu sous forme d'un solide beige (4,015g, 77%).

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, TMS, ppm) : δ = 3,61 (s, 3H, CH_3), 7,04 (d, 2H, 16,4 Hz, H_{Ar}).

SM (ESI+) m/z : 209 ($\text{M}+\text{H}^+$).

1,1'-dimethyl-1*H*,1'*H*-2,2'-biimidazole¹⁷⁹



FB $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4$.

PM 162,19 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Aspect : solide jaune-orange

Le 1-méthyl-2-iodo-imidazole (1,03 g, 4,95 mmole) est solubilisé dans 10 mL de diméthylformamide puis le cuivre (poudre, 630 mg) est additionné. Le milieu est porté à reflux et agité pendant deux heures. Après refroidissement, le mélange est traité avec 150mL d'une solution aqueuse saturée de chlorure d'ammonium, puis par 150 mL d'une solution saturée d'hydroxyde d'ammonium. L'ensemble est extrait au dichlorométhane (3 x 100 mL), les phases organiques réunies sont séchées sur sulfate de sodium anhydre puis, après évaporation du solvant, le résidu est chromatographié sur gel de silice pour fournir le produit pur sous forme d'un solide jaune (37 mg, 5%).

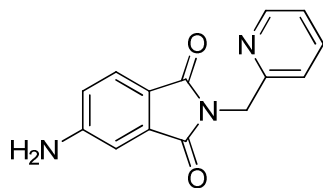
RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, TMS, ppm) : δ = 4,01 (s, 6H, CH_3), 6,95 (s, 2H, H_{Ar}), 7,10 (s, 2H, H_{Ar}).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, TMS, ppm): δ = 35,3, 122,6, 127,8, 138,7.

SM (ESI+) m/z : 163 ($\text{M}+\text{H}^+$).

¹⁷⁹ F. Mao, N. Mano, A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 4951; S.B. Park, H. Alper, *Chem. Commun.* **2004**, 1306; S.B. Park, H. Alper, *Org. Lett.* **2003**, 5, 3209; F. Bonati, A. Burini, B.R. Pietroni, B. Bovio, *J. Organomet. Chem.* **1989**, 375, 147; C. Lopez, A. Sanchez Gonzalez, M.E. Garcia, J.S. Casas, J. Sordo, *J. Organomet. Chem.* **1992**, 434, 261.

5-amino-2-(pyridin-2-ylméthyl)isoindoline-1,3-dione¹⁸⁰



FB C₁₄H₁₁N₃O₂.

PM 253,26 g·mol⁻¹.

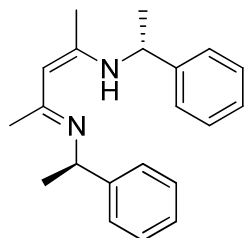
Aspect : solide jaune-orange

La 4-aminophthalimide (167 mg, 1 mmole) est mise en présence de 2-(aminométhyl)-pyridine (500 µL, 4,85 mmole) et l'ensemble est chauffé à 65°C pendant quatre heures. Après évaporation à sec le résidu est chromatographié sur gel de silice pour fournir le produit attendu sous forme d'une huile jaune (2 mg, 1%).

RMN ¹H (MeOD, 400 MHz, TMS, ppm) : δ= 3.35 (s, 2H, CH₂), 6.86 (d, 1H, 4 Hz, H_{Ar}), 7.02 (s, 1H, H_{Ar}), 7.33-7.29 (m, 2H, H_{Ar}), 7.54 (d, 1H, 8 Hz, H_{Ar}), 7.78 (t, 1H, 8 Hz, H_{Ar}), 8.44 (d, 1H, 4,8 Hz, H_{Ar}).

SM (ESI+) m/z : 254 ([M+H⁺])

(1R, 1'R, E)-N,N'-((Z)-pent-2-ène-2-yl-4-ylidène)bis(1-phényléthylamine)



FB C₂₁H₂₆N₂.

PM 306,44 g·mol⁻¹.

Aspect : solide jaune-orange

L'acétylacétone (400 µL, 3,88 mmole) et la (R)-méthylbenzylamine (500 µL, 3,88 mmole) sont placés dans 10 mL de toluène anhydre, puis 10 gouttes d'acide sulfurique concentré sont ajoutés. Le milieu réactionnel est porté à reflux dans un montage de type Dean Stark. Après une nuit, le milieu est neutralisé avec une solution aqueuse saturée de carbonate de sodium. Après évaporation du toluène, le résidu est repris dans 20 mL d'eau et extrait à l'acétate d'éthyle (3 x 20 mL). Les phases organiques réunies sont séchées sur sulfate de sodium anhydre, et, après évaporation le résidu est chromatographié sur gel de silice pour fournir le produit attendu sous forme d'une huile jaune (81 mg, 14%).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz, TMS, ppm) : δ= 1,53 (d, 6H, 6,8 Hz, CH₃), 1,77 (s, 6H, CH₃), 4,66 (quint, 2H, 7,2 Hz, CH₂), 4,98 (s, 2H, CH₂), 7,26-7,21 (m, 6H, H_{Ar}), 7,34-7,30 (m, 4H, H_{Ar}), 11,28 (sl, 1H).

¹⁸⁰ S. Banthia, A. Samanta, *Inorg. Chem.* **2004**, 43, 6890 (spectroscopie RMN).

Procédures opératoires pour le criblage des réactions par dosages immuno-enzymatiques

1. Composition des solutions tampon et des réactifs

Composition de la solution de réactif d'Ellman : 7.5×10^{-4} M iodure d'acétylthiocholine et 5×10^{-4} M acide 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoïque dans 0,1 M tampon phosphate, pH 7,4.

Composition de la solution tampon EIA : 0,1 M phosphate de potassium, pH 7,4, contenant 0,15 M NaCl, 0,1% BSA, et 0,01% azoture de sodium.

Composition de la solution tampon utilisée pour le lavage des plaques : 10 mM phosphate contenant 0,05% Tween 20.

L'acétylcholinestérase (AChE, EC 3.1.1.7) est purifiée à partir de l'organe électrique de l'anguille *Electrophorus electricus* comme précédemment décrit¹⁸¹ et utilisée sous sa forme globulaire G4¹⁸².

Préparations des traceurs enzymatiques

Traceur enzymatique H3-AChE : 100 µg (0,32 nmoles) d'AChE sont dissous par 500 µL de tampon borate 0,1 M pH 9. 10 nmoles (31 éq.) d'haptène H3 possédant un ester activé sont additionnés sous forme de solution dans du DMF (5 µL d'une solution à 2 mM). Après 30 min. de réaction, 500 µL de tampon EIA sont additionnés. Le traceur enzymatique est purifié par chromatographie d'exclusion sur Biogel A 0,5 M puis stocké à -80°C jusqu'à son emploi.

Traceur enzymatique N-benzoyl-lysine-AChE : 1 µmole de N-benzoyl-lysine et 12 µmoles de S-acétylglycolate de N-hydroxysuccinimidyl (SATA) sont dissous dans 400 µL de tampon borate 0,1 M pH 9. La solution est laissée à réagir à t.a. pendant 30 min. L'haptène dérivatisé est rapidement purifié sur colonne de silice greffée (Sep-Pack) en utilisant un mélange composé de méthanol/acide acétique 4% (v/v) 90/10 comme éluant. La solution ainsi purifiée est lyophilisée puis le solide obtenu est repris dans du tampon phosphate 0,1 M ajusté à pH 6. 200 µL d'hydroxylamine 1M à pH 7 sont alors additionnés. 2,5 nmoles d'haptène ainsi fonctionnalisé sont mis à réagir sur 0,25 nmole d'AChE préalablement dérivatisée à l'aide de l'agent hétérobifonctionnel SMCC (10 éq. de SMCC par rapport à l'AChE dans du tampon borate 0,1 M à pH 9). La réaction a lieu à 30°C pendant 3 heures. Le traceur enzymatique est purifié par chromatographie d'exclusion sur Biogel A 0,5 M puis stocké à -80°C jusqu'à son emploi.

Traceur enzymatique AcM 46-AChE : 10 µL d'une solution de SATA (5,7 mg/mL) dans la DMF sont additionnés à 125 µg d'anticorps monoclonal AcM 46 dissous dans 600 µL de tampon borate 0,1 M pH 8,5. Après 30 min de réaction à t.a., 200 µL d'hydroxylamine 1M sont additionnés pour déprotéger les fonctions thiols. L'anticorps possédant les fonctions thiols libres est purifié par chromatographie sur une colonne Sephadex G-25 (1 x 25 cm, éluant tampon phosphate 0,1 M, pH 6, 5 mM EDTA). L'anticorps ainsi fonctionnalisé est mis en présence d'AChE préalablement dérivatisé à l'aide de l'agent hétérobifonctionnel SMCC (10 éq. de SMCC par rapport à l'AChE dans du tampon borate 0,1 M à pH 9). La réaction a lieu à 30°C

¹⁸¹ J. Massoulié, A. McMillan, K.N.F. Shaw, *Biochem. Biophys. Acta* **1957**, 25, 422.

¹⁸² P. Pradelles, J. Grassi, D. Chabardes, N. Guiso, *Anal. Chem.* **1989**, 61, 447.

pendant 3 heures. Un large excès d'anticorps est utilisé pour cette réaction par rapport à l'enzyme (55 pour 1). Le traceur enzymatique est purifié par chromatographie d'exclusion sur Biogel A 15 M puis stocké à -20°C jusqu'à son emploi.

Contrôle des traceurs enzymatiques

Après l'étape de synthèse, chaque lot de traceur enzymatique est soumis à deux tests de validation :

- Un test d'Ellman afin de mesurer son activité enzymatique (en UEll¹⁸³)

100µL de traceur enzymatique purifié dilué au centième dans du tampon EIA sont additionnés à 1mL de réactif d'Ellman 10⁻¹M, l'absorbance à 414 nm résultant de l'activité enzymatique est mesurée toutes les 10 secondes pendant 1 min.

- Un test immunologique afin de mesurer l'immunoréactivité du nouveau traceur enzymatique.

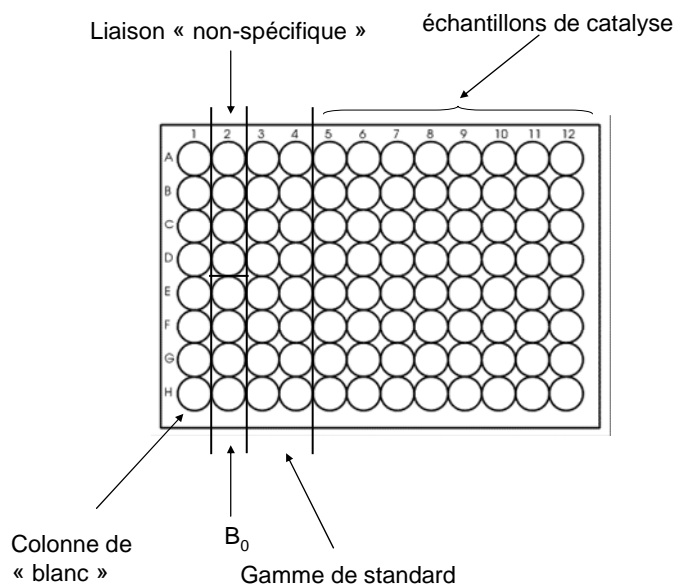
L'immunoréactivité des traceurs **H3-AChE** et **N-benzoyl-lysine-AChE** est évaluée par la mesure des B₀ et un test de compétition de liaison permettant l'établissement de la gamme d'étalonnage du produit à doser (procédure décrite ci-dessous).

L'immunoréactivité du traceur **AcM 46-AChE** est évaluée par la mesure des B₀ et un test de liaison permettant l'établissement de la gamme d'étalonnage du produit à doser (procédure « sandwich » décrite ci-dessous).

2. Test par compétition

Procédure générale

Le criblage des réactions de catalyse s'est opéré en duplicate dans des plaques de 96 puits selon le schéma général suivant :



¹⁸³ Une UEll est définie comme étant la quantité d'enzyme produisant un accroissement d'absorbance optique d'une unité à 414 nm pendant une minute, dans un volume de 1 mL de milieu d'Ellman, pour un trajet optique de 1 cm, à 25°C. Une unité Ellman correspond à 7,35·10⁻² unités enzymatiques, l'unité enzymatique UE étant définie comme la quantité d'enzyme catalysant l'hydrolyse d'une µmole de substrat pendant une minute à 25°C.

Colonne **1** : réactif d'Ellman uniquement

Puits **2A-2D** : témoin de liaison non-spécifique : traceur enzymatique à 2 UEll (50µL) et tampon EIA (100µL)

Puits **2E-2H** : Bo, témoin de liaison maximale du traceur : traceur enzymatique à 2 UEll (50µL) , anticorps (50µL) et tampon EIA (50µL).

Colonnes **3** et **4** : compétition de liaison avec le produit de référence. Gamme d'étalonnage : traceur enzymatique à 2 UEll (50µL), anticorps (50µL), produit à huit concentrations différentes, en duplicate (50µL).

Colonnes **5** à **12** : Dosage des échantillons. Compétition de liaison avec le produit formé lors de la catalyse : traceur enzymatique à 2 UEll (50µL), anticorps (50µL), échantillon de catalyse (50µL).

Préparation des plaques 96 puits

Les plaques Maxisorb (Nunc, Roskilde, Denmark) sont traitées, dans un premier temps avec 200 µL/puits d'une solution d'anticorps* à 10 µg/mL dans du tampon phosphate 50 µM. Après 12 heures à t.a. les plaques sont lavées puis saturées avec de la BSA suite à l'ajout de 300 µL par puits d'une solution de BSA à 1 mg/mL. Les plaques sont ensuite gardées à 4°C.

2.3. Test immunologique par compétition pour la détection des α-hydroxyacides

Conditions de catalyse :

Réaction d'insertion : Le catalyseur préformé (métal 0,125 µmole, ligand 0,2375 µmol, eau 0,25 µmol, 30 min) est additionné sur le composé diazo 2,5 µmole et H₂O 7,5 µmol, volume total DCE 150 µL ; 25°C, 18h. Concentration finale en substrat 16,66 mM.

Réaction de réduction : Le catalyseur préformé (métal 1 µmol, ligand 1 µmol dans 10 µL DCE 30 min), est ajouté au cétoester 10 µmoles et à la dihidropyridine 14 µmoles, 25°C, 72 h. Concentration finale en substrat 0,5 M.

Criblage :

Les mélanges bruts issus de l'expérience de catalyse sont dilués dans du tampon EIA jusqu'à des concentrations théoriques en substrat de 200 µM (pour l'AcM 6) et 20 µM (pour l'AcM 8). 50 µL des solutions résultantes sont additionnés à une solution contenant 50 µL de traceur enzymatique H3-AChE à 2 UEll et 50 µL d'une solution d'anticorps monoclonal énantiospécifique à 10 ng/mL dans du tampon EIA. Le mélange résultant est transféré dans une plaque 96 puits Maxisorb préparée comme décrit ci-dessus. Après une nuit d'incubation à 4°C, les plaques sont lavées et 300 µL du réactif d'Ellman sont additionnés. Après deux heures à t.a. les plaques sont révélées par lecture de la densité optique à 414 nm.

Pour la réalisation des gammes de standard deux solutions mères d'α-hydroxyacide (*p*-*t*Bu-MA) sont utilisées. Pour l'énantiomère (*S*) le premier point est fixé à une concentration de 1 mM tandis que pour l'énantiomère (*R*) le premier point correspond à une concentration de 100 µM. Les points de gamme suivants sont obtenus par dilutions successives (facteur de dilution = 2) en partant des solutions précédentes.

* anticorps polyclonaux chèvre anti-souris (Jackson Immuno. Research Laboratories Inc.) pour les plaques utilisées pour la détection des α-hydroxyacides, anticorps polyclonaux souris anti-lapin (Jackson Immuno. Research Laboratories Inc.) pour les plaques utilisées pour la détection des acides aminés *N*-benzoylés.

2.4. Test immunologique par compétition pour la détection des acides aminés *N*-benzoylés

Conditions de catalyse :

Au mélange de 9,85 μ moles d'oxazolone, et de lipase (2 UE), 3 μ eq. de H₂O sont additionnés sous forme de solution dans 20 μ L d'acétonitrile anhydre. 37°C – 72 h. Concentration finale en substrat 492,5 mM.

Criblage :

Les mélanges bruts issus de l'expérience de catalyse sont dilués dans du tampon EIA jusqu'à des concentrations spécifiques pour chaque série d'expérience utilisant une oxazolone (voir tableau ci dessous). Dans les puits d'une plaque 96 puits (Maxisorb Nunc, Roskilde, Denmark préparée comme décrit ci dessus) sont additionnés 50 μ L des solutions résultantes, 50 μ L de traceur enzymatique et 50 μ L d'une solution d'anticorps polyclonaux énantiospécifiques (obtenus par une dilution d'un facteur 10⁶ des sera correspondants obtenus suite à l'immunisation). Après une nuit d'incubation à 4°C, les plaques sont lavées et 300 μ L du réactif d'Ellman sont additionnés. Après deux heures à t.a. les plaques sont révélées par lecture de la densité optique à 414 nm. Pour la réalisation des gammes de standard deux solutions mères d'acide aminé *N*-benzoylé sont utilisées. Les valeurs correspondantes aux premiers points de gamme sont indiquées dans le tableau suivant. Les points de gamme suivants sont obtenus par dilutions successives (facteur de dilution = 2) en partant des solutions précédentes.

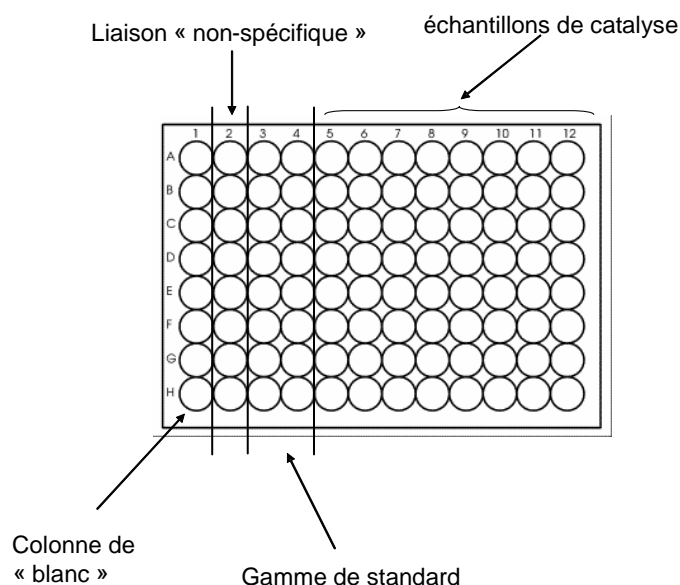
	Gamme d'étalonnage		Dilution des échantillons de catalyse	
	1 ^{er} point de gamme (R)	1 ^{er} point de gamme (S)	Dosage du (R)	Dosage du (S)
R	μM	μM	Facteur de dilution	Facteur de dilution
	3,00	56,0	1/164	1/8,8
	2,50	1,60	1/197	1/308
	1,10	0,40	1/448	1/1231
	0,50	0,50	1/985	1/985
	0,60	3,00	1/821	1/164
	4,30	14,2	1/115	1/34,7
	0,60	0,90	1/821	1/547
	0,30	1,90	1/1642	1/259
	5,30	8,10	1/92,9	1/60,8
	6,70	1,60	1/73,5	1/308
	0,80	1,40	1/61,6	1/352
	2,30	1,90	1/214	1/259
	2,10	1,00	1/235	1/493
	1,00	1,00	1/493	1/493

Tableau. Valeurs des concentrations utilisées pour les premiers points de gamme standard dans les cas des 14 acides aminés *N*-benzoylés

3. Test immunométrique (« sandwich »)

Procédure générale

Le criblage des réactions de catalyse s'est opéré en duplicate dans des plaques de 96 puits selon le schéma général suivant :



Colonne 1 : réactif d'Ellman uniquement

Colonne 2 : témoin de liaison non-spécifique : traceur enzymatique à 10 UEll (50µL) et tampon EIA (50µL).

Colonnes 3 et 4 : Gamme d'étalonnage du produit de référence : traceur enzymatique à 10 UEll (50µL) , produit à huit concentrations différentes, en duplicate (50µL) .

Colonnes 5 à 12 : Dosage des échantillons : traceur enzymatique à 10 UEll (50µL) , échantillon de catalyse (50 µL) .

Préparation des plaques

Les plaques Maxisorb (Nunc, Roskilde, Denmark) sont traitées, dans un premier temps avec 150 µL/puits d'une solution d'anticorps AcM 138 anti-histamine à 10 µg/mL dans du tampon phosphate 50 µM, pH 7.4. Après 12 heures à t.a. les plaques sont lavées puis saturées avec de la BSA suite à l'ajout de 300 µL par puits d'une solution de BSA à 1 mg/mL. Les plaques sont ensuite gardées à 4°C.

3.3. Test immunométrique à base d'anticorps monoclonaux pour la détection des produits issus des réactions de couplage

Les mélanges bruts issus de l'expérience de catalyse sont dilués dans du tampon EIA jusqu'à une concentration en substrat de 20 nM. 100 µL de la solution obtenue précédemment sont transférés dans une plaque Maxisorb (AcM 138) préparée comme décrit précédemment. Après une incubation d'une nuit à 4°C, la plaque est lavée et 100 µL d'une solution d'anticorps traceur (AcM 46-AChE) à 10 UEll/mL sont additionnés dans les puits. Après une nuit d'incubation à 4°C, les plaques sont lavées et 300 µL du réactif d'Ellman sont additionnés. Après deux heures à t.a. les plaques sont révélées par lecture de la densité optique à 414 nm.